

Chemo-enzymatische Werkzeuge zur Untersuchung von nicht-codierender RNA

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Marlen Hesse

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Christoph Arenz

2. Prof. Dr. Oliver Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2016

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
Kurzfassung	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	7
2 Stand der Forschung	9
2.1 Nicht-codierende RNAs, miRNAs und RNA-Interferenz	9
2.2 miRNA-Biogenese und -Silencing-Reaktionsweg.....	11
2.3 miRNA-Funktionsassays zur Detektion und Quantifizierung	13
2.4 Funktionsassays zur Untersuchung der Modulation der miRNA-Reifung durch niedermolekulare Verbindungen (<i>small molecules</i>)	17
2.5 Therapeutische Ansätze für miRNA-beeinflusste Erkrankungen	22
2.6 Chemo-enzymatische Methoden zur Generierung spezifischer mono- und bis-gelabelter RNA / pre-miRNA / nicht-codierender RNA.....	26
2.7 Click-Chemie und ihre Nutzung für bioorthogonales Labeling.....	32
3 Zielstellung	35
4 Ergebnisse und Diskussion	39
4.1 Chemo-enzymatische Methoden zur Zyklisierung von RNA.....	39
4.1.1 Modifizierung am 3'-Ende durch Ligation.....	41
4.1.2 Modifizierung am 5'-Ende über <i>in-vitro</i> -Transkription	46
4.1.3 Zyklisierungsreaktion mittels CuAAC	52
4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion der chemo-enzymatischen Methoden zur RNA-Zyklisierung.....	59
4.2 Synthese von mono und dual gelabelten pre-miRNA-Sonden zur Lokalisierung der miRNA-Reifung <i>in cellulo</i>	63
4.3 BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungs-Assay	73
4.3.1 Vorversuche zum Ago2-vermittelten Spaltungsassay mit gelabeltem und ungelabeltem Substrat	74

4.3.2	Etablierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays.....	80
4.3.3	Zusammenfassung und Diskussion zum BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay.....	89
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	93
5.1	Chemo-enzymatische Methoden zur Zyklisierung von RNA.....	93
5.2	Synthese von mono und dual gelabelten pre-miRNA-Sonden zur Lokalisierung der miRNA-Reifung <i>in cellulo</i>	96
5.3	BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungs-Assay	98
6	Experimenteller Teil	103
6.1	Generelles Vorgehen beim Arbeiten mit RNA	103
6.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	103
6.3	Lösungen und Puffer.....	103
6.4	Enzyme, Kits und DNA/RNA-Marker.....	104
6.5	Template, Oligonukleotide, RNA-Bausteine	105
6.6	Messgeräte	109
6.7	Molekularbiologische Methoden	110
7	Literaturverzeichnis	117
8	Anhang.....	125
	Danksagung.....	129
	Selbständigkeitserklärung	130

KURZFASSUNG

Nicht-codierende RNAs sind ein bedeutender Bestandteil regulatorischer Prozesse im menschlichen Organismus. Die eingehende Untersuchung dieser RNA-Gruppe zu ihrer regulatorischen Wirkung in der Genexpression ist zu einem wesentlichen Bestandteil der Forschung geworden. Kleine, nicht-codierende RNAs sind in der Lage, über den Prozess der RNA-Interferenz eine posttranskriptionelle Regulation auf mRNA-Ebene zu bewirken.^[1-3] Eine irreguläre Expression kleiner, nicht-codierender RNAs steht in Zusammenhang mit zahlreichen Krankheitsbildern, darunter diverse Krebserkrankungen, neurodegenerative und kardiovaskuläre Erkrankungen.^[4] Eine weitere Gruppe stellen die langen, nicht-codierenden RNAs dar, zu denen auch zirkuläre RNAs (circRNAs) gehören. Obwohl nur wenig über ihre Funktion bekannt ist, konnte bereits eine genregulatorische Bedeutung von circRNAs nachgewiesen werden.^[5]

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener Testsysteme zur Untersuchung nicht-codierender RNAs mit dem Schwerpunkt *microRNA* (miRNA) bzw. *precursor* miRNA (pre-miRNA) und circRNA. Für die Herstellung und Funktionalisierung von circRNAs zur Identifizierung zellulärer Interaktionspartner und zugehöriger Wirkmechanismen wurden erste Modifizierungen an den Termini linearer RNA-Template durchgeführt. Mit Hilfe enzymatischer Techniken wie Transkription und Ligation konnte *in vitro* die Inkorporation chemisch funktionalisierter Nukleotid-Bausteine am 5'- und 3'- Terminus gezeigt werden. Die Modifizierung mit jeweils einer Azid- und Alkin-Einheit an den Termini sollte eine Zyklisierung durch kupferkatalysierte Click-Chemie ermöglichen.

Zur Untersuchung der miRNA-Reifung *in cellulo* wurde die pre-miRNA-134 über chemo-enzymatische Methoden mit einem Fluorophor/Quencher-Paar an den Termini ausgestattet. Durch intrazelluläre Reifung der pre-miRNA-Sonde mit einhergehender Fluoreszenzfreisetzung sollte die Visualisierung und damit die Lokalisierung des miRNA-Reifungsortes innerhalb von Neuronen realisiert werden.

Des Weiteren gelang die Etablierung eines auf *branched rolling-circle amplification* (BRCA) basierenden *Argonaute2*(Ago2)-vermittelten Spaltungsassays. Ein als *minimal RISC* bezeichneter Komplex bestehend aus rekombinantem, humanem Ago2 (rhAgo2) und der miRNA miR-122 wurde dabei zur Substrat-Spaltung eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Detektion der Ago2-vermittelten Spaltung eines mRNA-ähnlichen Substrates mit der BRCA möglich war. Dabei wurde eine Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals im BRCA-Detektionsschritt von der Substratmenge, der Ago2-Enzymkonzentration und der Inkubationszeit im Spaltungsschritt beobachtet. Zur Etablierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays als Screening-Methode zur Identifizierung potentieller Inhibitoren der mRNA-Spaltung wurde exemplarisch eine Auswahl an Testsubstanzen aus der Gruppe der Aminoglykoside untersucht. Unter sechs getesteten Aminoglykosiden konnte eine unterschiedlich starke Verminderung der Ago2-Aktivität festgestellt werden. Das Ergebnis der unterschiedlichen Ago2-Aktivität bei Zugabe der sechs verschiedenen Aminoglykoside stand dabei in

Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen RNA und dieser Substanzklasse. Damit konnte beispielhaft die Anwendung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays zur Nutzung als Screeningtool für Testsubstanzen demonstriert werden. Zur Validierung des genannten Assays als Quantifizierungsinstrument wurde gezeigt, dass in einem definierten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Substratmenge und Fluoreszenzanstieg bestand. Eine Auswertung der gebildeten Menge an Spaltprodukt durch Standardaddition ergab einen Anteil von ca. 6 %, der von 100 nM mRNA-ähnlichem Substrat mit 40 nM rhAgo2 innerhalb von 60 min gespalten wurde. Der BRCA-basierende Ago2-vermittelte Spaltungsassay stellte eine einfache und zuverlässige Detektionsmethode dar, der die Untersuchung einer größeren Probenzahl mit geringem Aufwand und ohne Verwendung radioaktiv oder fluorogen gelabelter Substrate ermöglichte.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a. u.	<i>arbitrary units</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Abb.	Abbildung	EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ACN	Acetonitril	em	Emission
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin	EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
Ago	<i>Argonaute</i> / Argonaut	Eppi	Mikroreaktionsgefäß
Ago2	<i>Argonaute 2</i> / Argonaut 2	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> / und andere
AGS	<i>human gastric adenocarcinoma cells</i>	EtOH	Ethanol
ALX	Fluorophor Alexa Fluor® 633	ex	Anregung
Amicon	Amicon® Ultra-0.5 ml	<i>F</i>	Fluoreszenz
ApG	Adenylyl-3',5'-guanosin	F	Fluorophor
APS	Ammoniumpersulfat	FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Äq.	Äquivalente	FIT	<i>forced intercalation</i> / erzwungene Interkalation
ATA	Aurintricarboxylsäure	FLB	<i>Formamide Loading Buffer</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FP	Fluoreszenzpolarisation
Ax633	Fluorophor Alexa Fluor® 633	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Azido-G	5'-Azido-5'-Deoxyguanosin	FXR1	<i>fragile X mental retardation-related protein 1</i>
bp	Basenpaar(e)	ggf.	gegebenenfalls
BRCA	<i>branched rolling-circle amplification</i>	Gla	<i>Giardia lamblia</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / Rinderalbumin	GMP ^{Prg}	O-(5'-Guanosin)-O-propargylmonophosphat
bzw.	beziehungsweise	GTP	Guanosintriphosphat
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	h	Stunde(n)
ca.	circa	HAsc	Ascorbinsäure
CDR1as	<i>cerebellar degeneration-related protein 1 transcript antisense</i>	HCC	hepatozelluläres Karzinom
CDS	codierende Sequenz	HCV	Hepatitis-C-Virus
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>	HEN1	RNA-2'-O-Methyltransferase
circRNA	<i>circular RNA</i> / zirkuläre RNA	HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ciRS-7	<i>circRNA sponge for miR-7</i>	HSC70	heat shock cognate 70
CRKL	<i>v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like</i>	HSP90	heat shock protein 90
CRKLsh	<i>CRKLshort</i>	IC50	halbmaximale inhibitorische Konzentration
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition	IEDDA	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf
Cy3	<i>Cyanine 3</i>	<i>ihT7-RNAPol</i>	<i>in-house-T7-RNA-Polymerase</i>
DAB	DabcyI	let-7	<i>lethal-7</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat	Limk1	<i>LIM domain kinase 1</i>
denat.	denaturierend	LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>	lncRNA	lange, nicht-codierende RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	M	Molarität
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
dNaM	2-Methoxy-3-methylnaphthalin	mer	Oligomer
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	MID	<i>Ago2 middle domain</i>
Ds	7-(2-Thienyl)imidazol-[4,5-b]pyridin	min	Minute(n)
dsDNA	Doppelstrang-DNA		
dsRNA	Doppelstrang-RNA		
DTT	1,4-Dithiothreitol		

miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>	RP	<i>reversed phase</i>
miRNA	<i>microRNA</i> / mikroRNA	rRNA	ribosomale RNA
mRNA	<i>messenger RNA</i> / Messenger-RNA	RT	Raumtemperatur
MRX34	miR-34-Mimetikum	RT-qPCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i>
N	<i>Ago2 N-terminal domain</i>	SD	<i>standard deviation</i> /
N ₃	Azidogruppe		Standardabweichung
N ₃ -G	5'-Azido-5'-Deoxyguanosin	shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
NaOAc	Natriumacetat	siRNA	<i>small / short interfering RNA</i>
nat.	nativ	sog.	sogenannt
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat	Sry	<i>sex-determining region Y</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid	ss	Einzelstrang
Nor-UB TP	Norbornen-tragende unnatürliche Base	ssDNA	Einzelstrang-DNA
	Triphosphat	ssRNA	Einzelstrang-RNA
nt	Nukleotid(e)	stRNA	<i>short temporal RNA</i>
PA	Polyacrylamid	Sub	Substrat
Pa	Pyrrol-2-carbaldehyd	<i>SYBR Gold /</i>	Cyanin-basierender
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	<i>Green</i>	Nukleinsäurefarbstoff
pAp	Adenosin-3',5'-bisphosphat	<i>SYBR Gold</i>	<i>SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain</i>
PAZ	<i>Piwi-Argonaute-Zwille</i>	<i>SYBR Green</i>	<i>SYBR® Green Nucleic Acid Gel Stain</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> /	t	Zeit
	Phosphatgepufferte Salzlösung	T4, T7	Bakteriophagen
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	T4-Rnl1	T4-RNA-Ligase-1
pCp	Cytidin-3',5'-bisphosphat	T7-Kit	<i>TranscriptAid T7 High Yield</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> /		<i>Transcription Kit</i>
	Polymerase-Kettenreaktion	TBE	Tris/Borat/EDTA
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
pdCp	2'-Desoxy-Cytidin-3',5'-Bisphosphat	TEAA	Triethylammoniumacetat
pdUPrg	2'-Desoxy-5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>	Temp.	Templat
PIWI	<i>P-element Induced Wimpy Testis</i>	Tgs	Trimethylguanosin-Synthase
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>	THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
PNK	T4-Polynukleotidkinase		Schmelztemperatur
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>	Tm	
Prg-pG	O-(5'-Guanosin)-O-propargylmonophosphat	tr	Retentionszeit
pri-miRNA	primäre miRNA	TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
pUp	Uridin-3',5'-bisphosphat	Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
pUp ^{Alk}	3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethinyluridin	tRNA	<i>transfer RNA</i> / Transfer-RNA
pUPrg	5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin	U	Unit (<i>activity of enzyme preparation</i>)
Px	2-Nitro-4-propinyl-pyrrol	u. a.	und andere(s), unter anderem/anderen
Q	Quencher	UTR	untranslatierte Region, untranslatierter Bereich
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>	UV	Ultraviolett
rGTP	Ribonukleinsäure-GTP, GTP	vgl.	vergleiche
rhAgo2	rekombinantes, humanes Ago2	VIS	visible
rhDicer	rekombinanter, humaner Dicer	z. B.	zum Beispiel
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex	λ em	Emissionswellenlänge / nm
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure	λ ex	Anregungswellenlänge / nm
RNAi	<i>RNA interference</i> / RNA-Interferenz		
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat		

1 EINLEITUNG

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein wichtiger Reaktionsweg zur Regulation der Genexpression und wird als *das* aktuelle Tor zur Eröffnung neuer therapeutischer Möglichkeiten angesehen, nicht zuletzt seit die Forscher Fire und Mello im Jahr 2006 für deren Entdeckung in *C. elegans* den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten.^[6] Doch bereits die Veröffentlichung der zugrundeliegenden Arbeit von Fire *et al.*^[7] im Jahr 1998 sorgte für Furore und viele neue Publikationen und Erkenntnisse kamen hinzu. Dazu gehörte die Identifizierung der beteiligten Enzym-Komponenten Dicer und RNA-induzierter Silencing-Komplex (RISC).^[8-10] So wurde allmählich realisiert, dass die ca. 21 nt kleinen *small interfering RNAs* (siRNAs) nicht allein für RNAi-basierende regulatorische Prozesse verantwortlich sind. Weitere nicht-codierende RNAs wurden entdeckt, zunächst ebenso kurze, für die sich die Bezeichnung *microRNAs* (miRNAs) etablierte.^[11-13] Als immer neue miRNA-Sequenzen identifiziert wurden, wollte die Forschung natürlich den Zweck für das augenscheinlich omnipräsente Vorkommen von miRNAs ergründen. Der Einstieg gelang über die zunächst als stRNAs (*short temporal RNAs*) bezeichneten miRNAs lin-4 und let-7, deren regulatorische Bedeutung durch temporäres Auftreten in einzelnen Entwicklungsstadien von *C. elegans* erkannt wurde.^[14, 15] Die Vermutung des in diesen Arbeiten bereits angedeuteten Zusammenhanges zwischen miRNAs und RNAi wurde bestärkt durch erste Erklärungsmodelle wie sie beispielsweise in Reviews von Hannon^[16], Cullen^[17] sowie McManus & Sharp^[18] veröffentlicht wurden. Das heutige Verständnis von RNAi impliziert miRNAs als einen festen Bestandteil von dessen Wirkmechanismus.^[19]

Eine wesentliche Erkenntnis der Gruppe um Fire war, dass bei der RNA-Interferenz die Inhibition der Gen-Expression durch Doppelstrang-RNA (dsRNA) nicht nur aufgrund von komplementärer Wechselwirkung nach dem Antisense-Modell vollzogen wird, sondern weitaus größeres Potential besitzt.^[20] Dieses wird durch die Beteiligung der Enzyme bzw. Enzymkomplexe Dicer und RISC verwirklicht, welche die Prozessierung und Aktivierung der aus dsRNA resultierenden siRNA ermöglichen.^[16] Durch die Wechselwirkung der siRNA mit einem RISC bildet sich ein aktivierter Komplex, der den entscheidenden Vorteil zu allein komplementärer Interaktion liefert: RNAi kann als katalytischer Prozess ablaufen, bei dem eine geringe Menge an siRNA die Spaltung einer Vielzahl an komplementären mRNA-Molekülen initiiert.^[20] In Kombination mit der großen Anzahl unterschiedlicher miRNA-Sequenzen, die dem Mechanismus der RNAi folgen, erschließt sich damit die Mächtigkeit dieses Werkzeuges, welches dem zentralen Dogma der Molekularbiologie hinzuaddiert werden kann.^[21]

Die Regulierung des Genoms durch miRNAs auf posttranskriptioneller Ebene wird mit einem Anteil von 30 % bis über 60 % angegeben, womit sogleich die regulatorische Bedeutung von miRNAs wie auch die Auswirkung bei deren Fehlregulierung erkennbar ist.^[3, 22, 23] Die biologische Funktion von miRNAs ist umfassend: Sie regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse in der Zell-Entwicklung,

der Zell-Differenzierung und dem Immunsystem.^[24] Darunter zählen neuronale, kardiovaskuläre, proliferative Prozesse, sowie zelluläre Aktivitäten, wie beispielsweise die Insulinausschüttung, die Neurotransmitter-Synthese und die Immunreaktion.^[24] Entsprechend ist eine Beteiligung von miRNAs an pathologischen Prozessen, die durch Veränderungen eines oder mehrerer miRNA-Expressionsmuster hervorgerufen wird, für verschiedene Erkrankungen festgestellt worden. Dazu zählen Krebserkrankungen, kardiovaskuläre, neurodegenerative und diverse weitere Krankheitsbilder, welche die Notwendigkeit der Identifizierung und Beeinflussung beteiligter miRNAs unterstreichen.^[4] Daraus begründet sich der stetige Versuch, spezifische, synthetische siRNAs, miRNAs sowie deren Mimetika oder Inhibitoren zu identifizieren und in therapeutische Ansätze einzubeziehen. Grundlage dafür sind gute Testsysteme *in vitro* und *in cellulo*, bevor weiterführende Untersuchungen im lebenden Organismus und in der Klinik durchgeführt werden. Nach wie vor laufen klinische Studien bis hin zu vielversprechenden Phase-III-Studien, die auf dem RNAi-Mechanismus basieren und bestimmte siRNAs oder miRNAs mit unterschiedlichen Methoden der Wirkstoff-Lieferung zur Behandlung diverser Erkrankungen nutzen. Insbesondere Lebererkrankungen und Augenerkrankungen sind dafür prädestiniert, aber auch verschiedene Krebsarten sind Ziel dieser Behandlungsform in klinischen Studien.^[25]

2 STAND DER FORSCHUNG

2.1 Nicht-codierende RNAs, miRNAs und RNA-Interferenz

Mikro-RNAs (*microRNAs*, miRNAs) sind kleine, nicht-codierende RNA-Moleküle von ca. 21-25 nt Länge sowie posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression.^[1, 2, 26] Sie gehören zur Gruppe der kleinen RNAs (*small RNAs*), in der zwischen miRNAs, siRNAs (*small interfering RNAs*) und piRNAs (*PIWI-interacting RNAs*) unterschieden wird.^[27] Zu deren Gemeinsamkeiten gehört die Länge von ca. 20-30 nt und die Assoziierung mit Proteinen der Argonautenfamilie (Ago-Proteine). Die kleinen RNAs sind eine der Hauptinitiatoren der Gen-Stilllegung (*Gene Silencing*), einem Prozess, der die Expression von Genen auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene reguliert.^[28]

Eine der posttranskriptionellen Regulierungsmöglichkeiten wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet.^[7] Bei der RNAi kommt es zur Protein-unterstützten Bindung einer kurzen siRNA- oder miRNA-Sequenz an eine mRNA, wodurch ein regulatorischer Prozess ausgelöst wird (Abb. 2.1.1). Während miRNAs im Genom codiert sind und aus haarnadelförmigen Präkursoren (pre-miRNAs) hervorgehen, können siRNAs endogenen und exogenen Ursprungs sein, hervorgehend aus langen dsRNA-Segmenten, die z. B. durch eine virale Infektion in den Organismus eingebracht wurden.^[29, 30] Unabhängig von deren Ursprung werden sowohl pre-miRNA als auch dsRNA von dem Enzym Dicer gespalten. Daraus gehen siRNA und miRNA hervor, die jeweils in einen RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) geladen werden. Der passagere RNA-Strang wird verworfen und nur der Leitstrang (*guide strand*) verbleibt im RISC. RNAi kann nun für siRNA wie für miRNA über die komplementäre Bindung des RNA-aktivierten RISC an eine Ziel-mRNA erfolgen. Eine perfekt komplementäre Bindung führt in beiden Fällen zur mRNA-Spaltung und deren Abbau. Im Gegensatz zur siRNA kann im Falle der miRNA eine nicht perfekt komplementäre Bindung an die Ziel-mRNA ebenfalls eine Inhibition hervorrufen, und zwar durch translationale Repression.

Neben den kleinen RNAs, die in Verbindung mit RNAi stehen, gibt es weitere nicht-codierende RNAs, die ebenfalls regulatorische Bedeutung in der Genexpression besitzen. Eine wichtige Gruppe sind die langen, nicht-codierenden RNAs (lncRNAs), deren Einfluss auf transkriptioneller, translatorischer oder funktionell auf Proteinebene erfolgen kann.^[31, 32] Eine seit erst wenigen Jahren in ihrer Funktion ansatzweise bekannte Gruppe ist die der zirkulären RNAs (circRNAs), welche u. a. als *miRNA sponge*, also als Binder von miRNAs fungieren können.^[33] CircRNAs zählen zu den lncRNAs und zeichnen sich durch hohe Stabilität aufgrund ihrer Zirkularität aus, welche durch eine kovalente Bindung von 3'- und 5'-Ende durch sog. Backsplicing entsteht.^[34] Obwohl circRNAs bereits im Jahr 1991 beschrieben wurden, hat sich die Bedeutung dieser ringförmigen RNAs erst später etablieren können, als die Häufigkeit des Vorkommens von circRNAs in eukaryotischen Organismen realisiert wurde.^[34-36] Informationen über die Funktion von circRNAs sind mit wenigen Ausnahmen nur in geringem Umfang

bekannt. So wurde herausgefunden, dass die circRNAs CDR1as/ciRS-7 und *Sry* circRNA spezifische miRNA-Fänger für miR-7 bzw. miR-138 sind.^[33] CDR1/ciRS-7 hat über 70 spezifische Bindungsstellen für die humane miRNA miR-7 und ist in vielen Geweben nachweisbar, und besonders häufig in bestimmten Hirnarealen anzutreffen.^[33, 37] Da für die beiden miRNAs miR-7 und miR-138 eine Verbindung zur Entstehung und Entwicklung von verschiedenen Krebsarten gezeigt wurde, konnten auch die beiden miRNA-bindenden circRNAs CDR1as/ciRS-7 und *Sry* in einen Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht werden.^[38] Ein weiterer Beleg für die Funktionalität von circRNAs ist, dass zumindest ein Teil der circRNAs in vielen Spezies konserviert vorliegt.^[5]

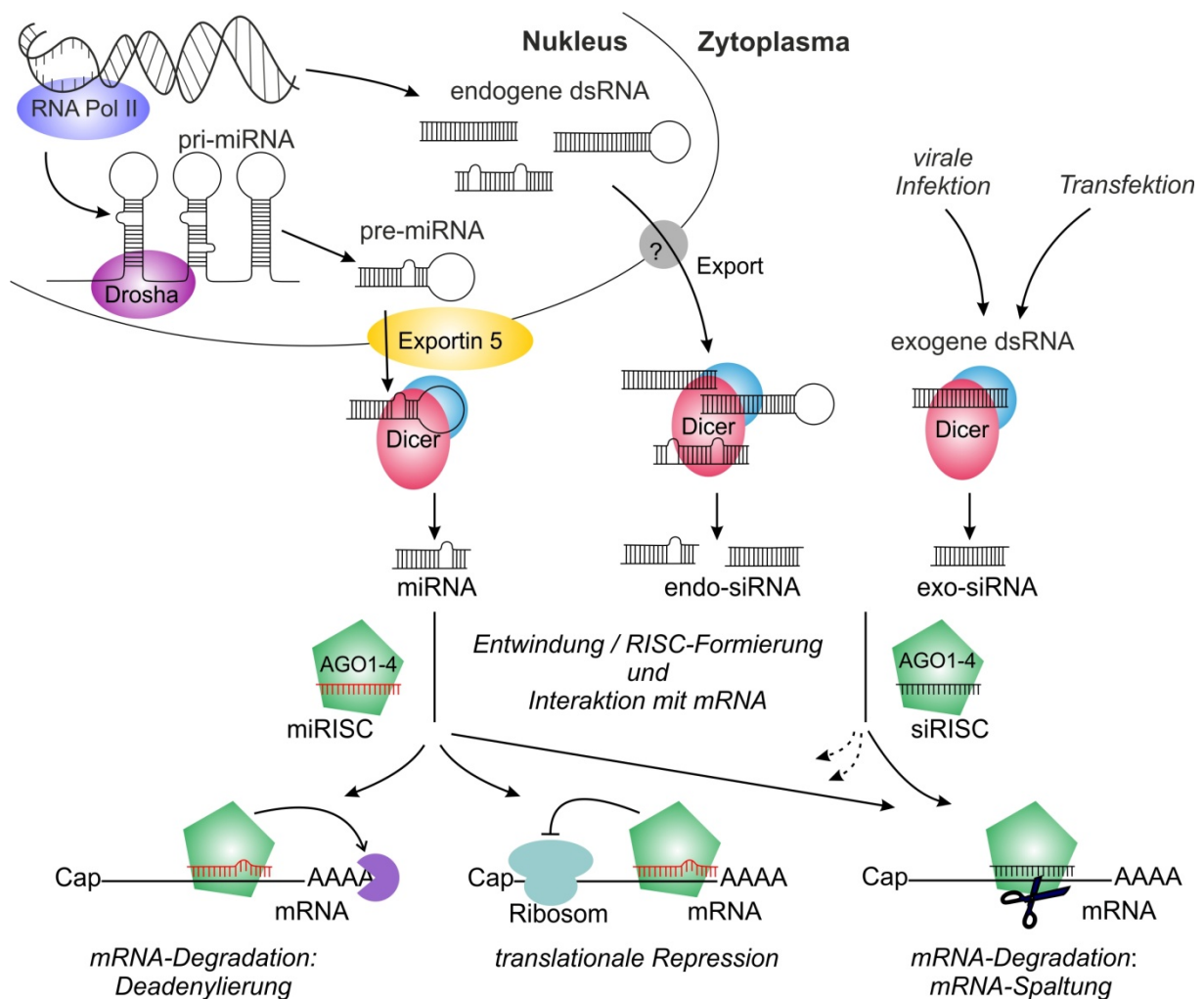


Abb. 2.1.1: Modell der Biogenese und der post-transkriptionellen Suppressionswege von miRNAs und siRNAs. Die RISC-Formierung kann für beide RNAs mit den Ago-Proteinen 1-4 erfolgen. Für miRNAs führt die Interaktion mit entsprechender mRNA zu translationaler Repression, mRNA-Degradation oder zu mRNA-Spaltung, wobei nur Ago2 Spaltungs-Aktivität besitzt. Für siRNAs wird vornehmlich von einer komplementären Bindung mit mRNA ausgegangen, die zur mRNA-Spaltung führt. Nicht perfekt komplementäre Bindung ist auch möglich und resultiert vermutlich in miRNA-ähnlichen Suppressionswegen, jedoch sind diese Mechanismen und deren Tragweite besonders für endo-siRNAs kaum bekannt. Die Reaktionswege von piRNAs wurden für dieses Schema nicht betrachtet. Das Schema wurde nach Modellen von He & Hannon^[2], Kim *et al.*^[27] sowie Carthew & Sontheimer^[39] erstellt.

Neue bioinformatische und biochemische Methoden ermöglichten die Identifizierung einer Vielzahl von circRNAs. Exemplarisch wurde bei den circRNAs CDR1as/ciRS-7 und *Sry* eine regulatorische Bedeutung bezüglich miRNAs festgestellt, wie auch eine gewisse Relevanz von circRNAs in der Transkriptionskontrolle.^[32] Damit verbunden stellte sich die Frage, inwiefern circRNAs generell an regulatorischen Prozessen beteiligt sind und was genau deren Funktionen umfassen, über die bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig bekannt ist. Gleichzeitig eröffnet sich mit dem Wissen um die vermutlich regulatorische Bedeutung der circRNAs die Möglichkeit für neue Therapieansätze, beispielsweise aufgrund der Beteiligung von miRNAs bzw. deren Fehlregulierung bei bestimmten Erkrankungen.^[34]

2.2 miRNA-Biogenese und -Silencing-Reaktionsweg

Die kanonische miRNA-Biogenese findet zuerst im Nukleus und anschließend im Zytoplasma statt (Abb. 2.2.1). Die miRNA ist im Genom codiert und wird im Zellkern durch die RNA-Polymerase II zur primären miRNA (pri-miRNA) transkribiert.^[40] Anschließend erfolgt das Capping, das Splicing und die Polyadenylierung der lokal haarnadelförmigen pri-miRNA.^[40] Diese wird dann von einem Spaltungsapparat, auch Mikroprozessor^[41, 42] genannt, zu der ca. 70 nt großen, haarnadelförmigen Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) prozessiert.^[43, 44] Der Mikroprozessor besitzt als Hauptkomponenten das RNase-III-Enzym Drosha und das Protein DGCR8.^[45] Drosha schneidet spezifisch etwa 11 bp entfernt von dem unteren Stammende der Haarnadelstruktur, was ungefähr 22 bp von dem oberen, schleifennahen Stammende entfernt ist.^[46, 47] Dabei wird der charakteristische Überhang am 3'-Ende von entweder 2 nt oder 1 nt erzeugt, wobei letzterer jedoch eine 3'-Mono-Uridylierung vor der weiteren Prozessierung durch Dicer benötigt.^[48] Nach dem Transport ins Zytoplasma durch Exportin 5^[49] wird die pre-miRNA von dem RNase-III-Enzym Dicer^[10] und dem Protein TRBP (*TAR RNA-binding protein*) zur doppelsträngigen, reifen miRNA prozessiert. Hierbei spaltet der Dicer asymmetrisch zwischen Schleife und Stamm der pre-miRNA, wobei der Abstand ausgehend von dem charakteristischen 3'- und 5'-Ende der pre-miRNA gemessen wird.^[50, 51] Daraus resultiert eine ca. 22 nt lange, reife miRNA mit 3'-Überhängen und 5'-Phosphatenden. Die Funktion von TRBP besteht zum einen in der Regulierung der Dicer-vermittelten Spaltung und zum anderen verbrückt es den Dicer mit den Enzymen der Argonauten-Familie, womit TRBP zur Bildung des miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) beiträgt.^[52, 53] Die Argonauten(Ago)-Familie kann in zwei Untergruppen unterteilt werden, die Ago-Untergruppe und die PIWI-Untergruppe.^[54-56] Die Proteine der Ago-Untergruppe werden ubiquitär in vielen Organismen exprimiert. Im menschlichen Organismus zählen die Proteine Ago1-Ago4 zu dieser Untergruppe, wobei nur Ago2 eine Spaltungsaktivität besitzt. PIWI-Proteine und die mit ihnen interagierenden piRNAs (*PIWI-interacting RNAs*) werden spezifisch in der Keimbahn exprimiert.^[57] Entsprechend assoziieren die Proteine der Ago-Untergruppe entweder mit siRNAs oder miRNAs, um den RISC zu bilden.^[58] Die RISC-Bildung erfolgt dabei in zwei Schritten: über Beladung eines Ago-Proteins mit dem miRNA-Duplex und der anschließenden Entwindung. Je nach Spezies ist die Präferenz

der Beladung eines spezifischen Ago-Typs mit einer bestimmten Duplex-RNA von miRNA wie auch siRNA unterschiedlich ausgeprägt.^[56] Im menschlichen Organismus ist beispielsweise keine strikte Präferenz vorhanden, da alle vier humanen Ago-Proteine sowohl miRNA- als auch siRNA-Duplexe assoziieren können.^[56, 59] Bei der Entwindung des Duplexes wird der Leitstrang von einem Ago-Protein einbehalten und der andere Strang entfernt. Die Auswahl erfolgt nach Gründen der thermodynamischen Stabilität, jedoch ohne absolute Striktheit:^[56] Der RNA-Strang, dessen 5'-Ende am thermodynamisch weniger stabilen Ende des Duplexes liegt, wird zum Leitstrang.^[60-62] Damit ist die RISC-Formation abgeschlossen und es folgt die Initiierung der posttranskriptionellen Genregulationsmechanismen.

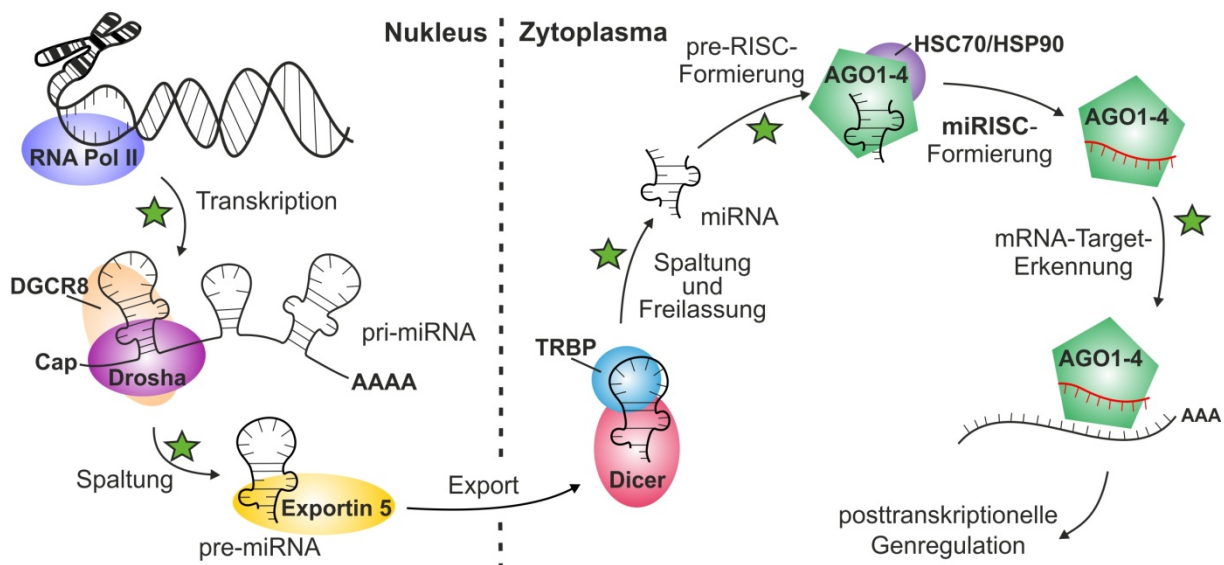


Abb. 2.2.1: Biogenese miRNA-Reifung und Eintritt in posttranskriptionelle Genregulationsmechanismen. DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8. HSC70: heat shock cognate 70. HSP90: heat shock protein 90. Pol: Polymerase. TRBP: TAR RNA-binding protein. RISC: RNA-induced silencing complex. Abbildung nach Vorlagen von Davies^[63] und Ha & Kim^[56].

Im Allgemeinen werden die Genregulationen auf posttranskriptioneller Ebene durch die Interaktion einer durch RISC rekrutierten miRNA mit der 3'-untranslatierten Region (UTR) einer Target-mRNA initiiert (Abb. 2.2.2). Dies führt meist zu Degradation oder translationaler Repression der mRNA.^[19, 64] Weitere Interaktionsmöglichkeiten sind die komplementäre Bindung an die 5'-UTR einer Target-mRNA, welche zu translationaler Repression oder Aktivierung führen kann,^[65, 66] oder die Bindung an die codierende Sequenz, aus der ebenfalls eine translationale Repression resultieren kann.^[67] Ebenfalls wurde ein davon abweichender Mechanismus, der zwischen Repression und Aktivierung während Proliferationsphase und Zellzyklusarrest unterscheiden kann, für miR369-3, let-7 und die synthetische miRcxcr4 beschrieben.^[68] Dabei erfolgte die Bindung zwar über die 3'-UTR der mRNA, jedoch wurde über miRNA-vermittelte Assoziierung von Ago2 und dem Protein FXR1 (*fragile X mental retardation-related protein 1*) eine translationale Aktivierung beobachtet.

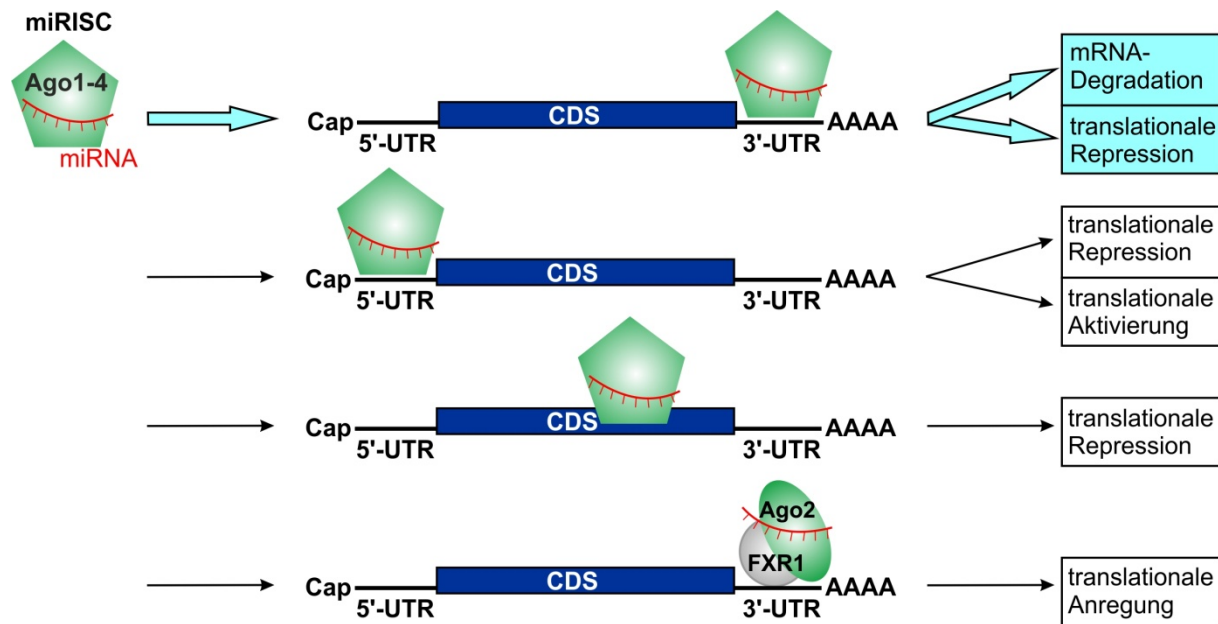


Abb. 2.2.2: Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von miRISC. miRISC: RISC in Assoziation mit miRNA. CDS: codierende Sequenz. FXR1: *fragile X mental retardation-related protein 1*. UTR: untranslatierter Bereich. Abbildung erstellt nach einer Vorlage von Ling *et al.*^[19].

Die Ago-Proteine gehören zu den RISC-Hauptkomponenten und besitzen eine Schlüsselfunktion in den RNA-Silencing-Reaktionswegen.^[69] Unter den Proteinen der humanen Ago-Familie, erwies sich Ago2 als einziges Protein mit Spaltungs-Aktivität und somit auch großer Bedeutung innerhalb des RISC in Bezug auf Gen-Silencing-Prozesse.^[70] Wie alle Ago-Proteine besitzt auch Ago2 eine PAZ- und eine PIWI-Domäne.^[54] Die Strukturanalyse prokaryotischer Homologe ergab eine Unterteilung in vier Domänen (N, PAZ, MID und PIWI) und zwei Linker-Domänen.^[71, 72] Durch die Aufklärung der Kristallstruktur des humanen Ago2 konnten detaillierte Erkenntnisse über den Bindungs- bzw. Spaltungsmechanismus gewonnen werden.^[73] Demnach erwies sich der mittig gelegene Spalt in der zweisegmentierten Struktur von zentraler Bedeutung bezüglich der Bindung von miRNA oder siRNA sowie von Target-RNA. Eine für Forschungszwecke verwendete, weniger komplexe Form des RISC besteht aus rekombinantem, humanem Ago2 (rhAgo2) und einer einzelsträngigen Leitstrang-miRNA. Dieser als *minimal RISC* bezeichnete Komplex wird *in vitro* zur Target-RNA-Spaltung eingesetzt.^[74]

2.3 miRNA-Funktionsassays zur Detektion und Quantifizierung

Die klassischen Detektionsmethoden für miRNAs sind die RT-qPCR und Microarray-Systeme. Damit können miRNAs identifiziert und quantifiziert werden, die als Regulatoren oder Biomarker agieren und damit für diagnostische und therapeutische Zwecke von Bedeutung sind. Eine weitere Methode ist die Northern-Blot-Analyse von miRNA-Expressionen, die jedoch den Nachteil hat, dass ein sehr hoher Probenverbrauch auftritt, ohne eine hohe Sensitivität zu erreichen oder einen hohen Durchsatz zu ermöglichen.^[24] Eine Schwierigkeit in der Detektion von miRNAs ist deren Größe, die einen geringen Massenanteil an der extrahierten Gesamt-RNA ausmacht. Im Falle der qPCR werden daher zur

Vorbereitung in der vorangehenden reversen Transkription zumeist Haarnadelprimer oder Poly-A-Verlängerungen, über einen vorangestellten Polyadenylierungsschritt, verwendet.^[75, 76] Die Wahl der geeigneten Detektionsmethode ist u. a. davon abhängig, ob eine qualitative oder quantitative Analyse durchgeführt werden soll. Für ein erstes Screening zum Testen des Vorhandenseins von miRNA-Sequenzen werden häufig Microarrays eingesetzt.^[77] Dieser Methode fehlt es jedoch an hoher Sensitivität, sodass es möglich ist, dass nicht alle miRNAs erfasst werden, insbesondere solche, die in geringen Mengen vorkommen. Die auf qPCR basierenden Methoden besitzen eine höhere Sensitivität und werden vermehrt zur Quantifizierung eingesetzt, allerdings fällt dies zulasten der Effizienz. Ein kombinierter Einsatz von qPCR mit Microarrays ist deshalb häufig das Mittel der Wahl, insbesondere für die Erstellung von miRNA-Profilen in klinischen Studien oder die diagnostische Anwendung bei Humanerkrankungen.^[77, 78]

Neben der Optimierung von den etablierten Methoden qPCR, Microarrays und Northern Blot befinden sich neue Techniken zur miRNA-Detektion in stetiger Erforschung.^[79] Einige basieren auf Fluorophor-gelabelten Oligonukleotiden, wie den molekularen Beacons und nutzen molekularbiologische Methoden unter Verwendung verschiedener Enzyme, wie Ligasen, Polymerasen, Nukleasen.^[24] Ein weiteres Untersuchungsgebiet zur Detektion von miRNAs ist die Nutzung von Biosensoren, die auf der Interaktion einer immobilisierten Einheit mit dem zu untersuchenden Molekül beruhen. Dadurch wird mithilfe eines sog. Transducers (Messwertgeber) eine optische, elektrochemische oder elektromechanische Veränderung der Signalweiterleitung hervorgerufen, wodurch die Detektion und Quantifizierung des Zielmoleküls möglich ist.^[80, 81]

Eine Enzym-basierende, einstufige miRNA-Detektionsmethode ist die Duplex-spezifische Nuklease-Signal-Amplifikation von Yin *et al.*^[82]. Sie beruht auf der Verwendung einer Taqman-DNA, die mit der Ziel-miRNA hybridisiert (Abb. 2.3.1). Eine Doppelstrang-spezifische Nuklease schneidet die Taqman-Probe im RNA-DNA-Duplex, was zu einem ausgeprägten Fluoreszenzanstieg führt, da die miRNA intakt bleibt und immer neue Taqman-Proben spalten kann. Gegenüber der RT-qPCR-Methode entfällt der reverse Transkriptionsschritt und eine unmittelbare Fluoreszenzmessung kann erfolgen. Die Methode ermöglichte dabei eine Detektion im femtomolaren Bereich. Allerdings wurde keine Unterscheidung zwischen pre-miRNA und reifer miRNA beschrieben, wie sie beispielsweise bei der Haarnadelprimer-basierenden reversen Transkription oder dem BRCA-basierenden Dicer-vermittelten Reifungsassay nach Neubacher *et al.*^[83] gemacht wird.

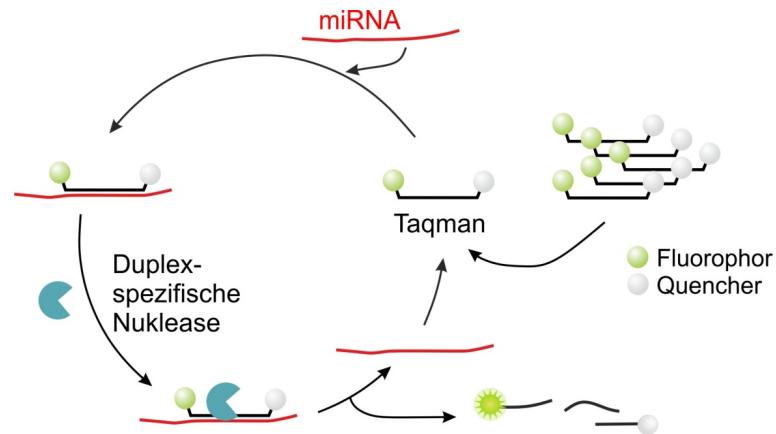


Abb. 2.3.1: Schematische Darstellung der Duplex-spezifischen Nuklease-Signal-Amplifikation. Die Duplex-spezifische Nuklease spaltet die Taqman-Probe nur im RNA-DNA-Duplex, unter Aufrechterhaltung der miRNA-Integrität. Abbildung modifiziert nach Yin *et al.*^[82].

Molekulare Beacons besitzen ähnlich der pre-miRNA eine Haarnadelstruktur mit einem FRET-Paar am 3'- und 5'-Ende. Enthält der Beacon eine bestimmte miRNA-komplementäre Sequenz, kann dieser mit der miRNA hybridisieren, was den Beacon öffnet, das FRET-Paar voneinander entfernt und zu einem detektierbaren Fluoreszenzanstieg führt. Duan *et al.*^[84] nutzten einen solchen Beacon und entwickelten eine Detektionsmethode für miRNA, die aufgrund ihrer Sensitivität eine Detektion auf Einzelzell-Niveau ermöglichte (Abb. 2.3.2). Diese Amplifikations-Methode, genannt *Quadric Isothermal Amplification*, nutzt die beschriebene Hybridisierung einer spezifischen miRNA mit einem FRET-Paar-gelabelten molekularen Beacon. Dadurch wird ein Fluoreszenzsignal freigesetzt. Der geöffnete Beacon kann dann mit einem Primer hybridisieren, der die Bst-Polymerase-induzierte Synthese eines DNA-Stranges initiiert, wodurch die miRNA wieder freigesetzt wird. Diese kann dann erneut einen Beacon öffnen, gefolgt von erneuter Fluoreszenzfreisetzung. Der entstandene Beacon/DNA-Duplex wird nun im zweiten Zyklus mit Nicking-Enzym und Exonuklease behandelt, wodurch der Beacon abgebaut und vom Polymerase-generierten DNA-Strang gelöst wird, jedoch weiterhin ein Fluoreszenzsignal abgibt. Der nun gelöste DNA-Strang kann analog zur miRNA weitere Beacons öffnen, die ein weiteres Fluoreszenzsignal freisetzen und nach Enzymbehandlung wiederum vom DNA-Strang abfallen. Mit dieser Methode wurde eine Detektion bis in den femtomolaren Bereich und bei der Verwendung von Zelllysate eine Detektion im Einzel-Zell-Bereich festgestellt.

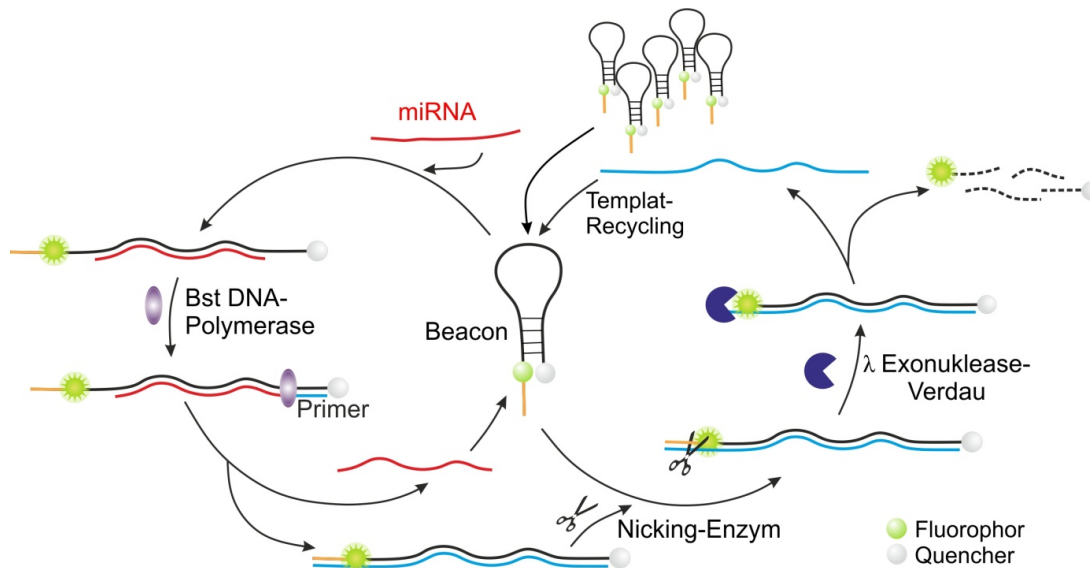


Abb. 2.3.2: Schematische Darstellung der Beacon-basierenden miRNA-Detektion durch *Quadric Isothermal Amplification*. Durch miRNA- und Templat-Recycling wird eine Verbesserung des Fluoreszenzsignals mit dem Ziel der höheren Sensitivität ermöglicht. Abbildung nach Duan *et al.*^[84].

Ein weiteres Mittel der Wahl ist die sog. *rolling-circle amplification* (RCA)^[85, 86], die als eine sensitive, spezifische, jedoch gleichzeitig einfache und kostengünstige Methode beschrieben wird.^[24] Der von Jonstrup *et al.*^[87] entwickelte RCA-Assay basiert auf der Verwendung von miRNA als RNA-Splint zur Ligation mit der T4-DNA-Ligase. Dabei erfolgt die Ligation einer Einzelstrang-DNA (ssDNA) zur zyklisierten ssDNA, die auch als Padlock bezeichnet wird.^[88] Der miRNA-Splint fungiert anschließend als Primer am Padlock und initiiert eine isotherme Amplifikation durch die Phi-29-DNA-Polymerase.^[87] Cheng *et al.*^[89] entwickelten diese Methode weiter, indem die Ligrationsreaktion unter Verwendung von RNA-Ligase-2 optimiert wurde (Abb. 2.3.3). Zusätzlich wurde zur Signalverstärkung ein zweiter Primer verwendet, der komplementär an das gebildete Concatamer bindet und zu einer verzweigten Amplifikation der RCA (*branched rolling-circle amplification*, BRCA) führt. Die Detektion der Amplifikation durch Phi-29-DNA-Polymerase erfolgte über die Endpunktmessung nach 6 h mit SYBR Green, wodurch eine homogene Quantifizierung des Fluoreszenzsignals im femtomolaren Bereich ermöglicht wurde.

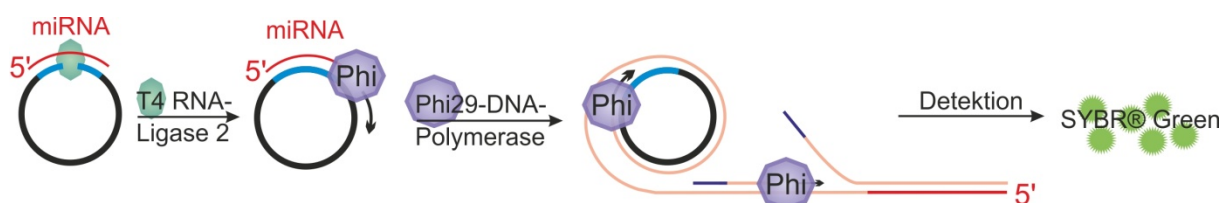


Abb. 2.3.3: Schematische Darstellung der BRCA-basierenden miRNA-Detektion. Die BRCA-Reaktion beruht auf der Verwendung der Phi29-DNA-Polymerase. Abbildung nach Cheng *et al.*^[89].

Ein auf BRCA basierender Assay zur Detektion der miRNA-Reifung auf Ebene des Dicer-vermittelten pre-miRNA-Spaltungsschrittes wurde im Arbeitskreis Arenz von Neubacher *et al.*^[83] entwickelt. Ein

wesentlicher Vorteil dieses BRCA-Assays gegenüber den vorangegangenen ist die Diskriminierung zwischen pre-miRNA und miRNA. Dabei dient reife miRNA ebenfalls als Primer an einem zirkulären Padlock-Templat und wird in einem vorhergehenden Schritt durch Dicerprozessierung einer pre-miRNA gewonnen (Abb. 2.3.4). Entgegen der Phi-29-DNA-Polymerase besitzt die in diesem Assay verwendete Bst-DNA-Polymerase (Large Fragment Bst DNA Polymerase) keine 3'-Exonuklease-Aktivität, was dazu führt, dass nur der 5'-Arm von Dicer-prozessierter pre-miRNA als Primer fungieren kann. Ein weiterer Vorteil ist die Detektion während der Amplifikation in Echtzeit und Auswertung der Änderung des Fluoreszenzanstieges über einen Detektionszeitraum von ca. 2 h. Da sich die Verwendung des BRCA-basierenden Dicer-vermittelten Reifungsassays vornehmlich auf die Untersuchung potentieller Inhibitoren der miRNA-Reifung konzentrierte, wurde im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten ein bereits zyklisiertes Padlock verwendet, sodass die miRNA nicht als Splint sondern nur als Primer diente. Außerdem wurde keine Total-RNA verwendet, sondern eine *in-vitro*-generierte pre-miRNA, wodurch die Problematik der Selektivität zwischen diversen pre-miRNAs/miRNAs nicht gegeben war. Der BRCA-basierende Teil kann jedoch potentiell zur Nutzung der Detektion einer miRNA aus Total-RNA, unter Beinhaltung der angesprochenen Vorteile der Diskriminierung von pre-miRNA gegenüber miRNA sowie der Detektion während der BRCA-Reaktion, verwendet werden.

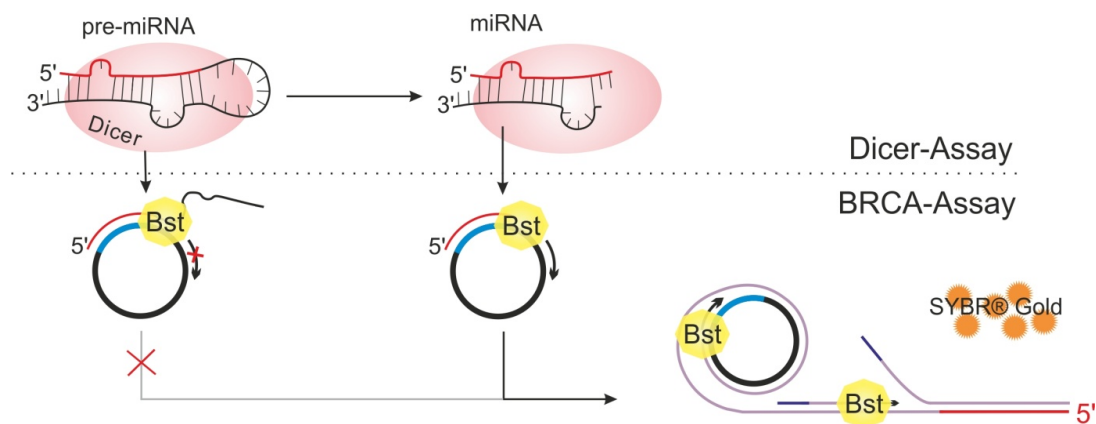


Abb. 2.3.4: BRCA-basierender Dicer-vermittelter miRNA-Reifungsassay. Im Dicer-Schritt erfolgt die pre-miRNA-Spaltung, wodurch reife miRNA entsteht, die im BRCA-Schritt als deren Initiator agiert. Abbildung modifiziert nach Neubacher *et al.*^[83] und Dojahn^[90].

2.4 Funktionsassays zur Untersuchung der Modulation der miRNA-Reifung durch niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*)

Untersuchungen zur miRNA-Reifung können mit Hilfe diverser Funktionsassays zumeist *in vitro* oder *in cellulo* erfolgen. Neben der Detektion und Quantifizierung von miRNAs ist die Identifizierung von potentiellen Inhibitoren der miRNA-Reifung ein umfassender Forschungsschwerpunkt. Für die

Inhibition oder Aktivierung von miRNA bzw. der miRNA-Reifung gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, da verschieden Interventionspunkte auf dem Weg der miRNA-Reifung vorhanden sind.^[22, 91, 92]

Ein häufig genutzter Interventionspunkt liegt auf Ebene der pre-miRNA-Prozessierung durch Dicer. Davies *et al.*^[93] entwickelten einen Fluoreszenz-basierenden Assay, der *in vitro* den Dicer-vermittelten Spaltungsschritt an zweifach terminal gelabelter pre-miRNA detektiert (Abb. 2.4.1). Dafür besaß die pre-miRNA-Sonde jeweils am Terminus ein Fluorophor bzw. einen Quencher. Durch die Dicer-vermittelte Spaltung an dieser pre-miRNA-Sonde wurde der Quencher-Effekt aufgehoben und ein Fluoreszenzanstieg über die Dicer-Inkubationszeit beobachtet. Die Enthebung vom Quenchereffekt beruht auf der Theorie, dass eine terminal verlängerte pre-miRNA mit glatten Enden von Dicer nicht nur in *Stem-Loop*-Nähe, sondern ebenso an den Termini gespalten wird.^[94] Mit diesem Assay konnten potentielle Inhibitoren der Dicer-Spaltung für eine pre-miRNA getestet werden. Es wurde eine Inhibition des Dicer-vermittelten Spaltungsschrittes für Kanamycin A aus der Gruppe der Aminoglykoside sowie für verschiedene Peptide und Aminoglykosid-Derivate festgestellt.^[93, 95, 96] Solche sogenannten kleinen Moleküle können speziell von den Prinzipien der RNA-Bindung profitieren. Besonders durch die natürliche Sekundärstruktur vieler RNAs, im speziellen der pre-miRNA mit ihren Schleifen und Ausbuchtungen (*loops and bulges*) sind sie ein attraktives Target.^[97] Aber auch elektrostatische und nichtionische Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen RNA und kleinen Molekülen.^[97]

Dieser Reifungsassay mit auf Fluorophor und Quencher beruhender Technik wurde von Vo *et al.*^[98] verwendet, um spezifische pre-miRNA-Binder auf Basis von Aminoglykosid-Nukleobase-Derivaten für pre-miR-372 und pre-miR-373 zu generieren. Dabei wurde gezeigt, dass die Konjugation von Neomycin B mit einer natürlichen oder unnatürlichen Nukleobase dessen Inhibitionswirkung der miRNA-Reifung auf Dicer-Ebene verstärkte. Für die pre-miR-372 wurden *in vitro* in Abhängigkeit von der verwendeten Nukleobase IC₅₀-Werte von ca. 105 µM bis ca. 2,4 µM erreicht, wobei Neomycin B ohne Konjugat einen IC₅₀-Wert von ca. 125 µM aufwies. Ein potenter Inhibitor unter ihnen wurde in zellulären Tests mit AGS-Krebszellen (*human gastric carcinoma cells*) inkubiert, in denen pre-miR-372/-373 überexprimiert vorliegen. Die Auswertung mit RT-qPCR ergab eine dosisabhängige Dezimierung der beiden pre-miRNAs, wobei auch einige andere getestete pre-miRNAs diesem Trend in unterschiedlicher Ausprägung folgten.

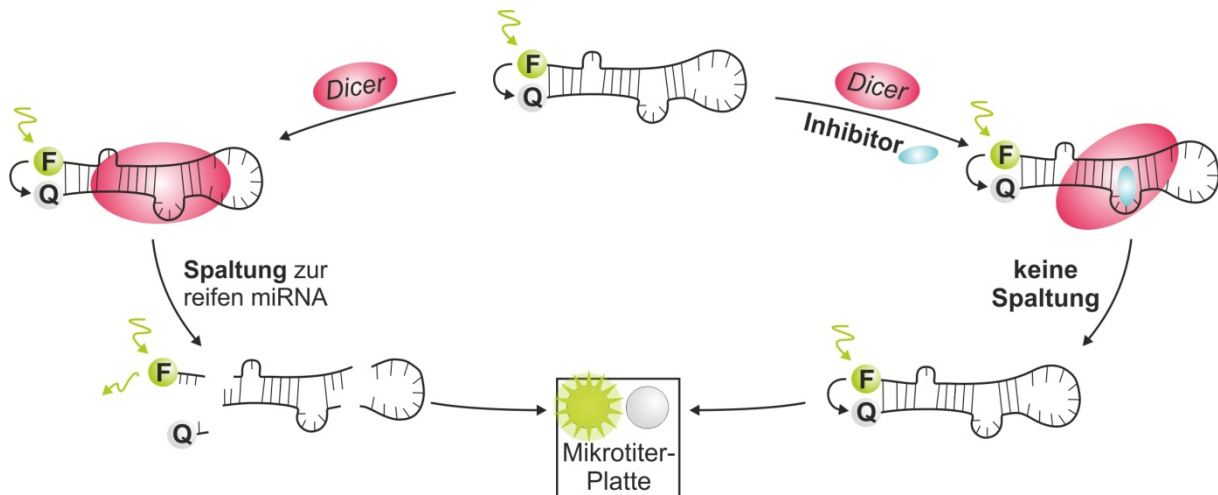


Abb. 2.4.1: Fluoreszenz-basierender Dicer-vermittelter miRNA-Reifungsassay. Wird die Dicer-Reaktion durch einen Inhibitor unterbunden, erfolgt keine Prozessierung der terminal verlängerten pre-miRNA mit glatten Enden und der quenchende Effekt bleibt erhalten. F: Fluorophor. Q: Quencher. Abbildung nach Davies^[63].

Um Selektivitätsprobleme zwischen den einzelnen pre-miRNAs zu überwinden, etablierten Velagapudi *et al.*^[99] eine computergestützte Screeningtechnik namens *Inforna*. Es wurden die Daten humaner pre-miRNAs einschließlich ihrer Sekundärstrukturinformation mit einer Datenbank über Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen und RNA-Strukturmotiven wie verschiedenen Schleifen, Ausbuchtungen oder deren Kombinationen verglichen und wahrscheinliche Interaktionspartner zu einer jeweiligen pre-miRNA gesucht. Unter den gefundenen erwies sich Benzimidazol gegenüber pre-miR-96 als selektivster Inhibitor der miRNA-Reifung *in cellulo*. Diese Selektivität gegenüber anderen pre-miRNAs wurde mit RT-qPCR anhand von zwei weiteren pre-miRNAs, die sich in ihrer Primärstruktur durch jeweils eine Nukleobase unterschieden, evaluiert. Dabei wurde eine deutliche Präferenz für pre-miR-96 gegenüber den Vergleichs-pre-miRNAs festgestellt.

Wie bereits beschrieben, wurde von Neubacher *et al.*^[83] ein BRCA-basierender Dicer-vermittelter Reifungsassay entwickelt (Abb. 2.3.4), dessen Funktionalität anhand der Untersuchung von einigen Aminoglykosid-Derivaten verdeutlicht wurde. Der Vorteil gegenüber dem Fluoreszenz-basierenden Assay unter Verwendung eines Fluorophor-gelabelten Beacons als pre-miRNA besteht in der Nutzung ungelabelter Substrate. Dies kann von Bedeutung sein, da ein Einfluss von Fluorophoren oder ähnlichen Erweiterungen auf das Enzymverhalten oder die Inhibitorwirkung von Testsubstanzen z. B. aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen oder sterischen Gegebenheiten nicht ausgeschlossen werden kann. Im selben Arbeitskreis wurde dieser BRCA-Assay ebenfalls von Dojahn^[90] genutzt, um die spezifische inhibierende Wirkung von Aminoglykosid-Derivaten aus einer umfangreichen Substanzbibliothek zu testen. Dafür wurden jeweils zwei pre-miRNAs kompetitiv in einem Dicer-vermittelten BRCA-Assay eingesetzt, mit zwei entsprechenden Padlocks, und durch das Screening bei einer bestimmten Konzentration die inhibierende Wirkung der einzelnen Derivate eruiert.

Gumireddy *et al.*^[100] fanden durch das Screening einer Substanzbibliothek mit einem Luciferase-basierenden Reporter-Assay zwei niedermolekulare Verbindungen als Inhibitoren von miR-21. Der

genutzte Assay beruht dabei auf der Verwendung eines Reporter-Konstruktes, basierend auf einem Lentivirus-Vektor, der ein Luciferase-Gen und downstream davon eine miR-21-komplementäre Sequenz in der 3'-UTR enthält, wodurch die Luciferase-Expression von der miRNA-bindenden Sequenz kontrolliert wird und damit die Detektion einer spezifischen reifen miRNA möglich ist (Abb. 2.4.2). Im Falle der in HeLa-Zellen überexprimierten, also zahlreich vorhandenen miR-21, wird durch Bindung dieser an die 3'-UTR eine Luciferase-Expression verhindert, was zu einem verminderten oder keinem Lumineszenzsignal nach Substratzugabe führt. Verhindert jedoch eine Substanz diese Bindung, wird ein stärkeres Lumineszenzsignal beobachtet. Weitere Untersuchungen mit RT-qPCR ergaben eine spezifische Interaktion unter Verwendung von miR-21 im Vergleich zu miR-30 und miR-93 und ließen eine Interaktion auf Ebene der pri-miRNA-Transkription vermuten.

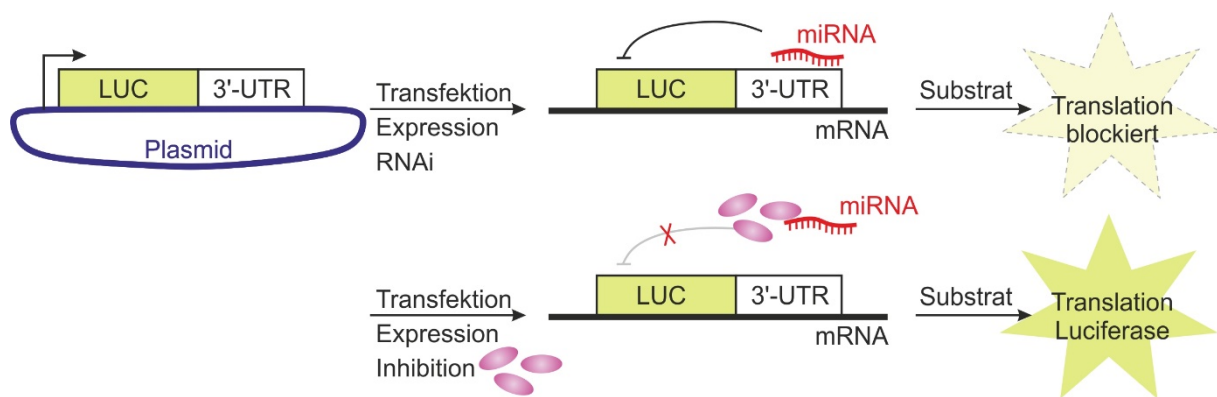


Abb. 2.4.2: Schematische Darstellung des Luciferase-Assays. Inhibition der RNAi kann dadurch erfolgen, dass ein Inhibitor die miRNA-Reifung in einem bestimmten Interventionspunkt verhindert. Die resultierende Dezimierung reifer miRNA führt zur Aufhebung der Translationshemmung, wodurch mehr Luciferase gebildet werden kann. Abbildung in Anlehnung an Gumireddy *et al.*^[100].

In einer anderen Arbeit wurden von Young *et al.*^[101] unter ähnlichem Setup bei der Verwendung des dualen Reportervektors psi-Check2 ebenfalls kleine Moleküle identifiziert, die entweder eine inhibierende oder aktivierende Wirkung hatten. Dies bietet einerseits Potential für die Behandlung der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion und andererseits zur Behandlung von Leberkrebs, da entsprechend eine Überexpression bzw. ein Verlust an miR-122 vorliegt. Weitere Untersuchungen mit RT-qPCR und zellbasierende Experimente bestätigten die Wirksamkeit gegen HCV und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) und zeigten eine Regulierung auf Ebene der pri-miRNA-Transkription.^[101]

Aminoglykoside sind eine oft zitierte Gruppe von RNA-Bindern. Unter ihnen wurde von Bose *et al.*^[102] das Tuberkulosemedikament Streptomycin als selektiver Inhibitor von miR-21 identifiziert. Untersuchungen zufolge könnte die Inhibition der miR-21-Reifung auf Ebene der Dicerprozessierung über die Bindung an pre-miR-21 erfolgen. Zur Identifizierung von Streptomycin wurden 15 verschiedene Aminoglykoside mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays in MCF-7-Zellen getestet. Diese Brustkrebszell-Linie exprimiert eine hohe Menge an miR-21, einer onkogenen miRNA, die in vielen Krebserkrankungen überexprimiert ist. Inhibition und Selektivität wurden in derselben Arbeit mit

der RT-qPCR verifiziert und analysiert. Bezüglich der Selektivität wurden neun weitere onkogene miRNAs getestet und die RT-qPCR ausgewertet, wobei acht davon keine durch Streptomycin veränderten Expressionslevel zeigten. Weitere Untersuchungen der Arbeit ließen eine Bindung von Streptomycin im Bereich der *Stem-Loop*-Übergangszone vermuten.

Neben der Möglichkeit der Bindung kleiner Moleküle an RNA ist ein anderer Interaktionsmodus der zwischen Protein und kleinem Molekül. Shan *et al.*^[103] entwickelten eine Screeningmethode zur Untersuchung von 2000 Substanzen, um potentielle RNAi-Modulatoren zu identifizieren. Dabei zeigte die antibakteriell wirkende Substanz Enoxacin einen verstärkenden Effekt auf die RNAi-vermittelte mRNA-Degradation.^[103, 104] Dies wurde auf die Interaktion von Enoxacin mit TRBP zurückgeführt, welche die unterstützende Funktion von TRBP bei der Beladung und Prozessierung von si/miRNA durch RISC weiter förderte.^[103] Der verwendete Screeningassay beruht auf einem *in-cellulo*-Reportersystem mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und einer entsprechenden Lentivirus-exprimierten shRNA (Abb. 2.4.3). Die Expression von EGFP wird über RNAi durch die Bindung der aus shRNA prozessierten siRNA verhindert, wodurch eine reduzierte Fluoreszenz zu beobachten ist. Unter Zugabe einer RNAi-aktivierenden Substanz wie Enoxacin wurde dieser Effekt verstärkt, was zu einer weiteren Herabsenkung der Fluoreszenz führte. Das Potential dieser Substanz für die Krebsforschung wurde in einer anderen Arbeit verdeutlicht, in der an verschiedenen Krebszelllinien und im Mausmodell gezeigt wurde, dass Enoxacin die Expression von miRNAs mit Tumor-Suppressor-Funktion verstärkte und dadurch eine krebspezifische, wachstumshemmende Wirkung aufwies.^[105]

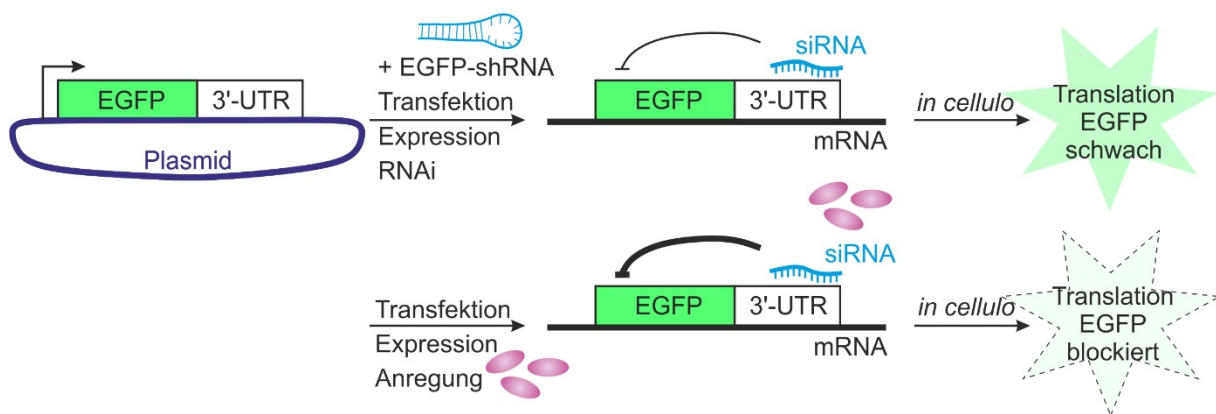


Abb. 2.4.3: Schematische Darstellung des EGFP-Assays. Eine Verstärkung von RNAi kann dadurch erfolgen, dass eine Substanz (symbolisiert durch rosa Ovale) die Prozessierung von shRNA stimuliert. Die aus Lentivirus-exprimierter shRNA hervorgehende siRNA bindet spezifisch an die EGFP-mRNA, wodurch die EGFP-Translation unterbunden wird. Je mehr siRNA vorhanden ist, umso geringer die EGFP-Translation und die Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu führte ein Inhibitor der siRNA-Prozessierung zu einer erhöhten Translation und einem erhöhte Fluoreszenzsignal. Abbildung nach Shan *et al.*^[103].

Tan *et al.*^[106] entwickelten als Screeningmethode einen Fluoreszenz-Polarisations(FP)-Assay, mit dem *in vitro* kleine Moleküle identifiziert wurden, welche die RISC-Beladung mit miR-21 inhibierten. Zu diesem Zweck wurden eine Tamra-gelabelte miRNA und rekombinantes Maus-Ago2-Enzym verwendet, und dem Reaktionsgemisch mit Testsubstanz zugegeben (Abb. 2.4.4). Die unkomplexierte

Tamra-miRNA rotiert schnell, was einen niedrigen Polarisationswert hervorruft. Bildet sich ein Tamra-miRNA/Ago2-Komplex aus, rotiert dieser langsamer als unkomplexierte Tamra-miRNA, wodurch ein erhöhter Polarisationswert registriert wird. Entsprechend kann der Effekt einer Testsubstanz auf die Bildung des Komplexes untersucht werden. Die drei Testsubstanzen Suramin, Oxidopamin HCl und ATA (Aurintricarboxylsäure) zeigten dabei den größten inhibitorischen Effekt *in vitro*. Weitere Experimente dieser Arbeit ergaben, dass ATA die vielversprechendste Substanz war, da sie die RISC-Beladung ebenfalls *in cellulo* inhibierte. Dies geschah jedoch ohne Sequenzspezifität für miR-21 und ohne bereits gebildeten miRNA-RISC-Komplex zu beeinträchtigen, was auf eine direkte Bindung an unbeladenem RISC schließen ließ, die eine Beladung mit miRNA inhibierte.

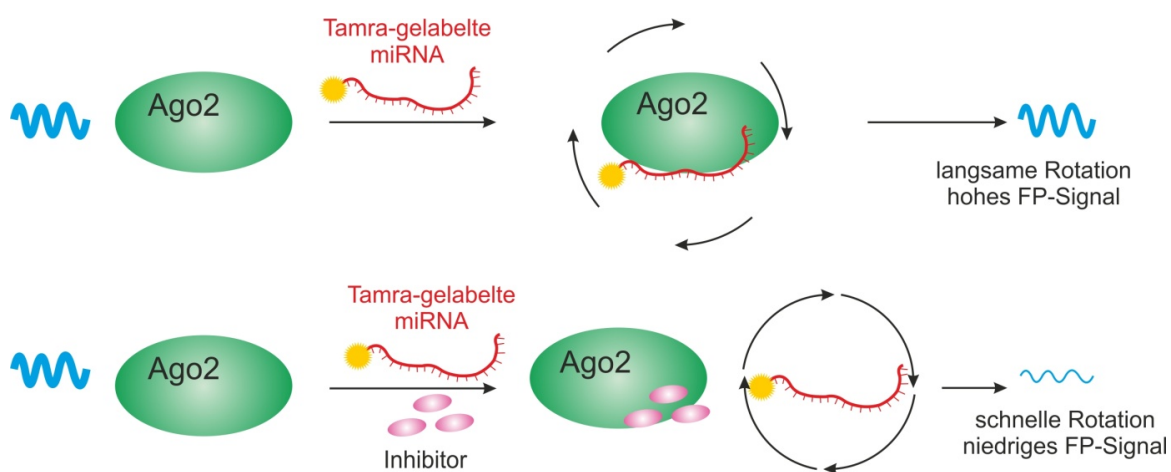


Abb. 2.4.4: Schematische Darstellung des Fluoreszenzpolarisations-Assays zur Untersuchung der RISC-Beladung mit miR-21. Das Fluoreszenzpolarisations(FP)-Signal kann durch die Bindungspartner der gelabelten miRNA beeinflusst werden. Abbildung modifiziert nach Tan *et al.*^[106].

Eine weitere Strategie der Inhibierung der miRNA-Funktion wurde von Schmidt *et al.*^[107] verfolgt. Die Autoren verwendeten eine Kombination aus PNA und kleinen Molekülen, wobei computergestützte Screeningmethoden und Modellierungen angewendet wurden. Aus Substanzbibliotheken konnten so niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, die mit dem aktiven Zentrum des Ago2-Enzyms interagierten. Ebenso wurde die Bindungsstelle für ein PNA-Tetramer im Bereich der *seed*-Region der verwendeten miR-122 ermittelt. Die so konstruierten Inhibitoren wurden in einem Ago2-vermittelten Spaltungsassay unter Verwendung des *minimal RISC*^[74] bestehend aus rekombinantem, humanem Ago2 und miR-122 getestet und die Spaltung des fluoreszenzgelabelten Substrates über PAGE-Analyse ausgewertet, wobei IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich ermittelt wurden.

2.5 Therapeutische Ansätze für miRNA-beeinflusste Erkrankungen

Das steigende Interesse, die miRNA-Biogenese bzw. die (fehl-)regulatorischen Prozesse nicht-codierender RNAs, speziell miRNAs, zu manipulieren, ist nicht nur durch den Versuch begründet, dessen mechanistische Abläufe und Einflussfaktoren detaillierter zu ergründen. Ebenso steht die

Nutzung einer solchen Manipulation bzw. Aufklärung zur Therapie und zur Analyse diverser Humanerkrankungen im Fokus.^[91] Da miRNAs die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene typischerweise durch Interaktion mit der 3'-UTR einer jeweiligen Ziel-mRNA regulieren, ist im Falle einer miRNA-Deregulierung die Assoziation mit einem entsprechenden Krankheitsbild naheliegend. So besteht in der Tat ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster verschiedener miRNAs und einer Vielzahl von Krankheiten.^[108] Dazu gehören in großem Umfang Krebserkrankungen, aber auch andere Erkrankungen stehen im Zusammenhang mit der veränderten Expression verschiedener miRNAs, wie z. B. kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes mellitus und virale Infektionen.^[4] Die erste Verbindung zwischen miRNAs und einer Krebserkrankung wurde von der Arbeitsgruppe um Croce bezüglich der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ gefunden.^[109] Viele weitere Arbeiten zeigen den Zusammenhang zwischen abnormer miRNA-Expression und einer Krebserkrankung, wobei miRNAs sowohl als Tumor-Promotoren (Oncomirs) als auch Tumor-Suppressoren (Anti-Oncomirs) wirken können.^[110] Der Grund für eine Fehlregulierung ist meist nicht bekannt, jedoch wurde festgestellt, dass viele miRNAs von Genabschnitten stammen, die mit einer Krebserkrankung in Zusammenhang stehen.^[108] Ebenso können Modifizierungen im Genom durch Mutationen, Deletionen, genomische Amplifizierungen oder chromosomale Neuordnung eine abnormale Expression von miRNAs hervorrufen, analog zu den Auswirkungen auf proteincodierende Gene.^[111] Eine weitere Ursache für die miRNA-Fehlregulierung sind Einschränkungen im Ablauf der miRNA-Reifung. Dabei kann eine Beeinträchtigung der Expression der beteiligten Enzyme vorliegen, wie es z. B. für das Dicer-Enzym bei der Erkrankung an Lungenkrebs gezeigt wurde.^[112] Gleichmaßen wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression der Ago-Proteine und verschiedener Tumorerkrankungen festgestellt.^[70, 111]

Die Entwicklung neuer Therapieansätze aufgrund des stetig wachsenden Wissens bezüglich der miRNA-Involvierung in ein Krankheitsbild unterliegt zwei grundlegenden Ansätzen: zum einen der angepassten Therapie durch Diagnose des miRNA-Expressionsmusters und zum anderen der Therapie durch direkte Beeinflussung eines abnormalen miRNA-Levels.^[113] Zu der letztgenannten Strategie zählt der Einsatz von RNA-Therapeutika, die entweder als herunterregulierende Antagonisten onkogener miRNAs oder als hochregulierende Tumor-Suppressor-miRNAs fungieren. Die häufigsten Methoden zur Blockade von miRNAs basieren auf der Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden, Antimirs (z. B. LNA), Antagomirs, miRNA-Sponges oder niedermolekularen Verbindungen (*small molecules*).^[19] Zur Wiederherstellung reduzierter miRNA-Levels werden miRNA-Mimetika, miRNA-Expressionsvektoren oder ebenfalls niedermolekulare Verbindungen verwendet.^[19] Unter dem Begriff Antagomirs werden spezielle Variationen von Antimirs zusammengefasst, beispielsweise chemisch modifizierte RNA-Analoga. Einige dieser Ansätze fanden bereits Einsatz in präklinischen oder klinischen Studien.^[19]

Die Wirkung einer Antagomir *in vivo* wurde erstmals in einer Arbeit von Krützfeldt *et al.*^[114] beschrieben, welche die selektive Inhibition der miR-122 im Mausmodell zeigte. Als am weitaus

häufigsten in der Leber vorkommende miRNA, ist die miR-122 ein Schlüsselement der hepatischen physiologischen und pathologischen Prozesse und stellt somit ein attraktives Target in der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Erkrankungen der Leber dar. Bei einer HCV-Infektion stimuliert miR-122 die Replikation des Virus über die Interaktion mit zwei Bindestellen der 5'-UTR des HCV-Genoms.^[115] Eine Reduktion von miR-122 würde demzufolge zur Inhibition der Virus-Replikation führen. Der erste miRNA-ansprechende Wirkstoff in klinischen Studien, Miravirsen, wurde gegen die Infektionskrankheit Hepatitis C entwickelt. Dieser Ansatz beruht auf der Inhibition von miR-122 mit einem LNA-basierenden Antisense-Oligonukleotid. Für Miravirsen, auch unter der Bezeichnung SPC3649 bekannt, konnte bereits die Phase 2 einer klinischen Studie abgeschlossen werden, in der sowohl die Toleranz wie auch die Wirksamkeit des Wirkstoffes untersucht wurde.^[116] Weitere Untersuchungen der Studie zeigten eine nicht-signifikante Beeinflussung der miRNA-Level anderer miRNAs als miR-122 im Plasma.^[117] Aktuell befinden sich weiter klinische Studien in Phase 2, welche z. B. die Kombination von Miravirsen mit Telaprevir und Ribavirin, zwei klassischen Kombinationswirkstoffen in der HCV-Therapie, untersuchen (clinicaltrials.gov).

Entgegen der HCV-Erkrankung werden andere Lebererkrankungen generell mit einer reduzierten Expression von miR-122 assoziiert, wie die chronische Hepatitis B oder HCC. Im Falle des Leberzellkarzinoms HCC, welches u. a. durch Virusinfektion verursacht werden kann, deutet ein Verlust an miR-122 auf schlechte Heilungschancen und Metastasenbildung hin.^[118] Des Weiteren konnten mehrere Target-Gene der miR-122 identifiziert werden, welche in die Leberzellkarzinogenese involviert sind.^[119] Daraus wurde abgeleitet, dass miR-122 als Tumorsuppressor in der Leber agiert. Diese Arbeiten demonstrieren die vielfältige Einbindung einer einzelnen miRNA in den Organismus und verdeutlichen die Schwierigkeiten beim Einsatz eines miRNA-manipulierenden Wirkstoffes, allgemein unter dem Begriff *off-target*-Effekt zusammengefasst. Dabei kann es zu dem Ansprechen eines weiteren, für eine Erkrankung irrelevanten Reaktionsweges kommen, der unter Umständen auch Housekeeping-Prozesse steuert.^[4]

Eine andere klinische Studie in Phase 1 wurde mit dem miR-34-Mimetikum MRX34 gestartet, welches in einer liposomalen Kapsel eingebettet ist und intravenös appliziert werden soll. Ziel dieser Studie stellt die Untersuchung der dosisabhängigen Verträglichkeit beim Patienten und initial der Wirksamkeit gegenüber HCC, Lymphomen, hämatologischen Malignomen und ausgewählten soliden Tumoren dar. Zahlreiche Untersuchungen belegen die Bedeutung von miR-34a als Schlüsselregulator in der Tumorsuppression, der antagonistisch unterschiedliche krebsrelevante Targets bedient.^[120] Es wurde bereits gezeigt, dass miR-34a in vielen soliden oder hämatologischen Malignomen reduziert oder komplett verschwunden ist, über den p53-Reaktionsweg agiert und als Repressor zahlreicher Onkogene wirkt.^[113] Eine vergleichende Arbeit zeigte jedoch auch, dass nicht für jede Krebsart übereinstimmende Ergebnisse bezüglich miR-34a unter den einzelnen Forschergruppen gefunden wurden.^[121] Besonders hohe Übereinstimmung für reduzierte miR-34a-Level wurde für Lungenkrebs und das Gliom gefunden, wohingegen Studien am HCC sowohl eine Hoch- als auch Herunterregulierung an miR-34a zeigten.

Die bereits erwähnte Methode der Nutzung von miRNA-Expressionsmustern als diagnostisches Werkzeug erfordert Studien zur Identifizierung von miRNA-Profilen bezüglich einer bestimmten Erkrankung. Zwei Herangehensweisen sind hier zu nennen. Zum einen besteht ein Interesse an der Früherkennung von Krankheiten, wie z. B. neurodegenerativer Erkrankungen, die bereits 20 Jahre vor ihrer ersten Symptomatik auftreten.^[122] Zum anderen steht eine differenziertere Diagnose und Kategorisierung von einer Erkrankung im Fokus, z. B. in der Bewertung von Tumoren bei Krebserkrankungen. Dadurch wird eine konkretere und somit effektivere Behandlung angestrebt. Ebenso können vergleichende Datenbanken mit erfolgreichen Therapieansätzen für das jeweilige miRNA-Profil einer Erkrankung angelegt werden, die der Auswahl einer geeigneten Medikation dienen. Diesbezüglich haben zirkulierende miRNAs das Interesse der Forschung erweckt, welche im Blut und anderen Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Urin und Speichel gefunden werden können und entsprechend eine gewisse Resistenz gegen enzymatischen Abbau aufweisen.^[123, 124] Durch ihre leichte, nicht-invasive Zugänglichkeit sind zirkulierende miRNAs ein attraktiver Kandidat für den Einsatz als Biomarker und in Expressionsprofilen.^[125] Viele Arbeiten beschreiben den Zusammenhang zwischen zirkulierenden miRNAs und einer Erkrankung bzw. einem Krankheitsstadium.^[123] Die Nutzung von zirkulierenden miRNAs als diagnostisches Werkzeug bringt jedoch auch einige Hindernisse mit sich: Die standardmäßig genutzten Detektionsmethoden RT-qPCR und Microarray-Technologie können jeweils ineffizient oder nicht sensitiv genug sein, sodass für ein gesichertes Ergebnis beide Methoden angewendet werden müssen.^[122, 126] Zum anderen kann ein verändertes miRNA-Profil auf verschiedene Erkrankungen zurückzuführen sein, was eine nichtgesicherte Diagnose zur Folge hat. Ein Vergleich mit miRNA-Profilen anderer Erkrankungen wäre eine notwendige Maßnahme. Ein weiterer Aspekt ist, dass zirkulierende miRNAs weniger Information liefern könnten als das miRNA-Expressionsmuster aus den relevanten Geweben oder der Cerebrospinalflüssigkeit, also nur invasiv zugänglichen Quellen.

Sowohl die Nutzung von zirkulierenden miRNAs wie auch von miRNAs aus Geweben als Biomarker wird in klinischen Studien untersucht (clinicaltrial.gov). Zirkulierende miRNA-Biomarker werden z. B. für eine frühzeitige Erkennung und Prognose von Sepsis herangezogen.^[127] Ein anderes Beispiel ist die Untersuchung der zirkulierenden miRNA-Profile zur Prognose des neurologischen Zustandes nach Herzstillstand.^[128] Weitere Studien, von denen sich eine bereits in Phase 4 befindet, befassen sich mit dem miRNA-Profil bei Brustkrebs und untersuchen z. B. die Veränderung der zirkulierenden Biomarker vor und nach einer Behandlung, den Therapieerfolg durch Chemotherapie bzw. Hormontherapie in Abhängigkeit des miRNA-Profils, oder auch die Erforschung eines veränderten Expressionsmusters zirkulierender miRNAs in Bezug auf kardiologische Nebenwirkungen nach chemotherapeutischer Behandlung (clinicaltrials.gov).^[129-131] Eine andere klinische Studie ist der Untersuchung des diagnostischen und prognostischen Potentials von zirkulierenden miRNAs bei Leberkrebs (HCC) gewidmet und der Identifizierung differenzierender miRNA-Signaturen.^[132]

Die Nutzung des miRNA- bzw. siRNA-Reaktionsweges als diagnostisches oder therapeutisches Mittel für zahlreiche Erkrankungen ist ein lohnenswertes Ziel. Das Potential ist dabei in einer sehr frühzeitigen

Erkennung und einer individuellen, auf das erfasste Krankheitsbild abgestimmte Behandlung zu sehen. Aus diesem Grund wird versucht, die Entwicklung voranzubringen und die unterschiedlichen Problemstellungen in der Anwendung zu überwinden. Wie bereits erwähnt, ist die diagnostische Anwendung von effizienten, sensitiven und reproduzierbaren Verfahren abhängig, deren Weiterentwicklung direkt zum Erfolg einer umfangreichen Anwendung beitragen kann. Eine therapeutische Nutzung von Antagonisten und Mimetika ist neben der Überwindung von *off-target*-Effekten in hohem Maße von einer erfolgreichen Darreichungsform abhängig. Möglichkeiten dafür sind u. a. die lokale Applikation durch Injektion in das erkrankte Gewebe, Transport über den Blutstrom durch intravenöse Injektion oder Transport über den Verdauungsapparat durch orale Verabreichung. Für alle Verfahren stehen die Gewährleistung der Wirkstoff-Stabilität, wie eine gewisse Resistenz gegen Nukleasen, und ein effizienter Transport zum Wirkort im Fokus. Dafür verwendete Modifikationen der Antagonisten oder Mimetika sind z. B. Cholesterol-Bausteine, Liposom-Komplexe, Antikörper-Protamin-Komplexe sowie diverse Zucker- und Rückgrat-Modifikationen.^[4, 133] Einige diagnostische Test-Systeme auf miRNA-Basis sind bereits auf dem Markt, wie z.B. von der Firma RosettaGenomics, die einen Diagnoseservice für die Klassifizierung bei Lungenkrebs, die Identifizierung des Krebsursprungsortes, eine genauere Diagnose von Schilddrüsen-Knötchen und die Diagnose bei Nierentumoren anbietet.^[134]

2.6 Chemo-enzymatische Methoden zur Generierung spezifischer mono- und bis-gelabelter RNA / pre-miRNA / nicht-codierender RNA

Das wachsende Interesse an nicht-codierenden RNAs und die stetige Identifizierung neuer zugehöriger Sequenzen erfordert Methoden zur Aufklärung von deren genauer regulatorischer Funktion im Organismus. Die Generierung fluorophorgelabelter RNAs ist neben deren Nutzung in fluoreszenzbasierenden *in-vitro*-Assays zur Funktionsaufklärung oder zu Inhibitor-Testzwecken eine Methode zur Visualisierung und Lokalisierung einer RNA *in cellulo*. Ebenso können spezifisch gelabelte RNAs zur Aufklärung der mit ihnen ablaufenden Prozesse in Zellen genutzt werden. Eine Fragestellung ist beispielsweise die Lokalisierung der Dicerprozessierung von pre-miRNAs in Neuronen, die für einige miRNAs in den Dendriten oder Axonen erfolgt.^[135, 136] Spezifisch gelabelte pre-miRNA-Sonden könnten den Ort der Reifung dokumentieren. Neben der Visualisierung ist auch die Analyse von Interaktionspartnern ein wichtiger Aspekt, der zur Funktionsaufklärung genutzt wird. Eine Möglichkeit ist die Modifizierung mit einer Biotingruppe, um mit Hilfe der *pull-down*-Methode beispielsweise Interaktionspartner aus Zell-Lysat zu isolieren. Bezugnehmend auf die lokale miRNA-Reifung in Neuronen kann eine solche Methode zur Identifizierung von Transportproteinen, mit denen Vorläufer-miRNAs innerhalb der Nervenzelle transportiert werden, von Nutzen sein.^[135, 136]

Eine vielfach verwendete Methode zur Herstellung von Oligonukleotiden ist die Festphasensynthese unter Verwendung von Phosphoramidit-Chemie.^[137] Diese Methode zeichnet sich durch gute Ausbeuten

und hohe Reinheit aus, die jedoch mit zunehmender Syntheselänge abnehmen.^[138] Für die Generierung langer RNAs ist eine enzymatische Herstellung von Vorteil, die Sequenzen von über 100 Nukleotiden bis in den Kilobasen-Bereich ermöglicht, ohne hohe Kosten zu verursachen. Eine Standardanwendung ist die *in-vitro*-Transkription ausgehend von einem DNA-Templat durch die T7-RNA-Polymerase, die bis zu Milligramm große Mengen an RNA produziert.^[139]

Für die Modifizierung von RNA-Transkripten können verschiedene Herangehensweisen betrachtet werden: Es ist zwischen einer lokal spezifischen und unspezifischen Modifizierung zu unterscheiden. Eine lokal unspezifische Modifizierung durch Einbau einer funktionellen Gruppe über einen modifizierten Nukleotid-Baustein erfolgt an mehreren Positionen im Transkript. Beispiele dafür sind der Einbau von Alkin-modifizierten Nukleotiden mit der T7-RNA-Polymerase^[140], Poly-A-Polymerase^[141] oder, im Falle eines intrazellulären, biosynthetischen Einbaus^[141, 142], mit Hilfe aller in Zellen vorkommenden Polymerasen. Neben einer lokalen Spezifität kann zwischen interner und terminaler Modifizierung unterschieden werden. Bei der terminalen Modifizierung handelt es sich um die Funktionalisierung des Nukleotids am 5'- oder am 3'-Ende einer RNA bzw. die Inkorporierung eines modifizierten Nukleotid-Bausteins an einem der beiden Termini. Eine ortsspezifisch, intern modifizierte RNA ist ein anspruchsvolles Zielmolekül, welches beispielsweise auch über eine Kombination von enzymatischen und chemischen Methoden generiert werden kann.^[143, 144]

Wie bereits erwähnt, ist die T7-RNA-Polymerase ein in der Molekularbiologie häufig verwendetes Enzym, welches die Transkription eines DNA-Templates mit geeigneter doppelsträngiger T7-Promotor-Sequenz zur gewünschten RNA realisieren kann.^[139] Da die Präferenz des Einbaus von Guanosin (G) als Starter-Nukleotid gegenüber den anderen Mononukleotid-Bausteinen deutlich größer ist, beginnt eine RNA-Sequenz in der Regel mit einem Guanosin in Form von GTP. Weitere Möglichkeiten sind der initiale Einbau von Dinukleotiden oder Oligonukleotiden, nach dem ApG-Muster generiert, wie es von Pitulle *et al.*^[145] bereits im Jahr 1992 gezeigt wurde, die ähnliche Ausbeute bzw. Einbaurate wie bei regulärem GTP-Einbau lieferten.

Der Einbau einer funktionalisierten Einheit am 5'-RNA-Ende wird enzymatisch durch die Verwendung eines modifizierten Starter-Guanosins realisiert (Abb. 2.6.1). Der ortsspezifische Einbau beruht auf der Tatsache, dass ein 5-modifiziertes Guanosin nur als Starter fungiert, also im Gegensatz zu den GTPs nicht innerhalb der Sequenz eingebaut werden kann. Die Gruppe um Jäschke entwickelte für diesen Zweck modifizierte Guanosin-5'-Monophosphat-Bausteine, die über einen Linker mit einer Amino- oder Thiol-Funktion am 5'-Arm funktionalisiert wurden.^[146] Eine entsprechende Konjugation in wässriger Lösung im Anschluss an die Transkription mit einem Aktivester- oder Maleimid-Derivat ermöglichte den ortsspezifischen Einbau von Biotin. Nach diesem Schema arbeitend, gibt es viele Varianten. Eine weitere Modifikation an gleicher Position stellte der Einbau einer geschützten Aldehyd-Gruppe dar, die nach Entschützung mit einem Hydrazin-Derivat reagieren kann.^[147, 148] Für die Funktionalisierung am 5'-Terminus mit Hilfe der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) wurde ein Guanosin-5'-Monophosphat mit einer Norbornen-Einheit modifiziert und als

Transkriptionsstarter verwendet.^[149] Die Dienophil-modifizierte RNA konnte anschließend mit einem Biotin- oder Fluorophor-gelabelten Tetrazin-Derivat unter milden Reaktionsbedingungen reagieren, die z. B. für eine zelluläre Anwendung von Vorteil sind. Paredes & Das^[143] verwendeten ein 5'-Azido-5'-Deoxy-Guanosin, um es als Starter via T7-Transkription in eine RNA-Sequenz von 66 nt Länge einzubauen. Die Reaktion des eingebauten Azido-Guanosins mit einem 3'-Alkin-RNA-Oligonukleotid über kupferkatalysierte Clickchemie und Analyse via PAGE diente dabei zur Überprüfung des Einbaus. Im Arbeitskreis Arenz wurde ein O-(5'-Guanosin)-O-propargylmonophosphat (GMP^{Prg}) entwickelt, das die ortsspezifische Modifizierung einer RNA mit einem Alkin-verlinkten Fluorophor am 5'-Ende einer RNA durch Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) im Anschluss an die Transkription ermöglichte.^[150]

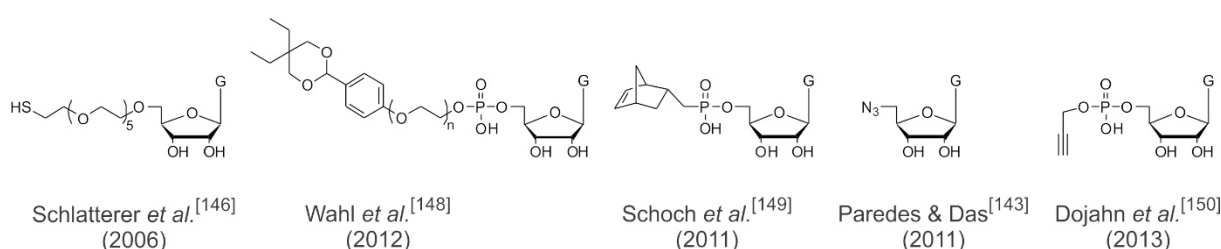


Abb. 2.6.1: Funktionalisierte Guanosin-Bausteine zur Modifizierung von RNA während der Transkription mit der T7-RNA-Polymerase über die Verwendung als Transkriptionsstarter.

Die 3'-terminale Modifizierung einer RNA mit der T4-RNA-Ligase-1 (T4-Rnl1) wurde Ende der 1970er Jahre bereits von der Gruppe um Uhlenbeck untersucht.^[151] Die T4-Rnl1 katalysiert die Reaktion zwischen einer RNA-Oligonukleotid-Sequenz mit einer 3'-OH-Gruppe als Akzeptor und einer ebensolchen Sequenz mit einer 5'-Phosphat-Gruppe als Donor. Dabei sollte der Akzeptor eine Mindestlänge von drei Nukleotiden aufweisen, wohingegen der Donor auch ein entsprechendes Mono- oder Dinukleotid sein konnte.^[152] Diese Arbeit von England & Uhlenbeck zeigte, dass die T4-Rnl1 mit beliebig langen RNA-Oligonukleotiden als Akzeptor funktionierte, auch wenn sie in geringer Konzentration vorlagen. Ebenso die Verwendung von 5'-Phosphat-Oligonukleotiden als Donor statt Mono- und Dinukleotiden erwies sich als möglich.^[153] Damit wurde das Potential der T4-Rnl1 für die molekularbiologische Nutzung gezeigt. Neben einer Erweiterung an Methoden zur RNA-Markierung mit ³²P wurde die universelle Einsetzbarkeit dieser Ligase demonstriert. Barrio *et al.*^[154] verwendeten verschiedene modifizierte 3',5'-Bisphosphat-Mononukleotide, die unter Verwendung der T4-Rnl1 am 3'-Ende von einem kurzen Oligonukleotid eingebaut werden konnten. Einige davon, wie das 3',5'-bisphosphorylierte lin-Benzoadenosin (Abb. 2.6.2) konnten fluoreszierend angeregt werden oder besaßen zusätzliche funktionelle Gruppen, meist als Modifikation an der Base. Diese Arbeit zeigte auch die Möglichkeit einer Folgeligation, indem ein modifiziertes Bisphosphat-Nukleotid an ein Oligonukleotid ligiert wurde, gefolgt von Entfernung der 3'-Phosphatgruppe durch Alkalische Phosphatase mit anschließender erneuter Ligation eines pAp-Nukleotides. In einer anderen Veröffentlichung der Gruppe wurde von Bruce *et al.*^[155] gezeigt, dass (¹²⁵I)-markiertes 5-Iodocytidin-

3',5'-bisphosphat ebenfalls einen geeigneten Donor in der Ligasereaktion darstellte. Kore *et al.*^[156] generierten verschiedene am C4 modifizierte Cytidin-5'-Monophosphate, unter anderem mit einer Amin- oder Biotin-Funktion versehen, die am 3'-Terminus einer RNA mit der T4-Rnl1 ligiert wurden. Im Arbeitskreis Arenz konnten verschiedene pCp- und pUp-Derivate erfolgreich am 3'-Ende von verschiedenen pre-miRNAs eingebaut werden. Dabei handelte es sich zum einen um ein an der NH₂-Gruppe modifiziertes Dabcyl-pCp, welches als Quencher an den 3'-Terminus eines pre-miRNA-Beacons eingebaut wurde.^[63] Zum anderen entwickelten Dojahn *et al.*^[150] diesen Ansatz weiter und stellten ein universell einsetzbares, am C5 Alkin-modifiziertes pUp (3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethynyluridin, pUp^{Alk}) her, welches ebenfalls über T4-RNA-Ligase am 3'-Ende inkorporiert wurde, und im Anschluss über CuAAC nach Belieben mit einem Azido-Derivat modifiziert werden konnte.

Eine andere Methode zur Herstellung 3'-modifizierter RNA ohne Verwendung der T4-Rnl1 basiert auf der Oxidation durch Natriumperiodat, welches am 3'- und 2'-OH des terminalen Nukleotides reagiert. Die nachfolgende Reaktion am Di-Aldehyd mit Hydrazin erlaubt z. B. den Einbau eines Fluorophors oder die Funktionalisierung mit einer Aminogruppe.^[157]

Wie bereits angedeutet, ist die T4-RNA-Ligase auch ein wichtiges Instrument zur Einführung ortsspezifischer, interner Modifikationen. Eine Kombination aus T4-RNA-Ligasereaktion und Periodat-Oxidation wurde von Kurata *et al.*^[144] beschrieben, die damit eine effiziente Methode zum internen Labeling von tRNA entwickelten. Dazu wurde die tRNA in zwei tRNA-Fragmente mit der Ligations-/Labeling-Position in einem *Loop*-Bereich unterteilt. Nach Ligation eines modifizierten pUp an das 3'-OH-Ende des 5'-tRNA-Fragmentes, wurden durch Oxidationsreaktion alle verbleibenden 3'-OH-Enden ohne pUp-Einheit inaktiviert. Dadurch stand dieses inaktivierte Fragment einer weiteren T4-RNA-Ligation mit dem 5'-Ende des zweiten, 3'-tRNA-Fragmentes nicht mehr zur Verfügung, als dieses der Reaktion zugegeben wurde. Da die Trennung von RNAs mit nur einem Nukleotid Unterschied generell weitaus schwieriger ist als die Abtrennung einer kürzeren RNA, stellt diese Methode eine mögliche Alternative für internes, ortsspezifisches Labeling von RNA dar.

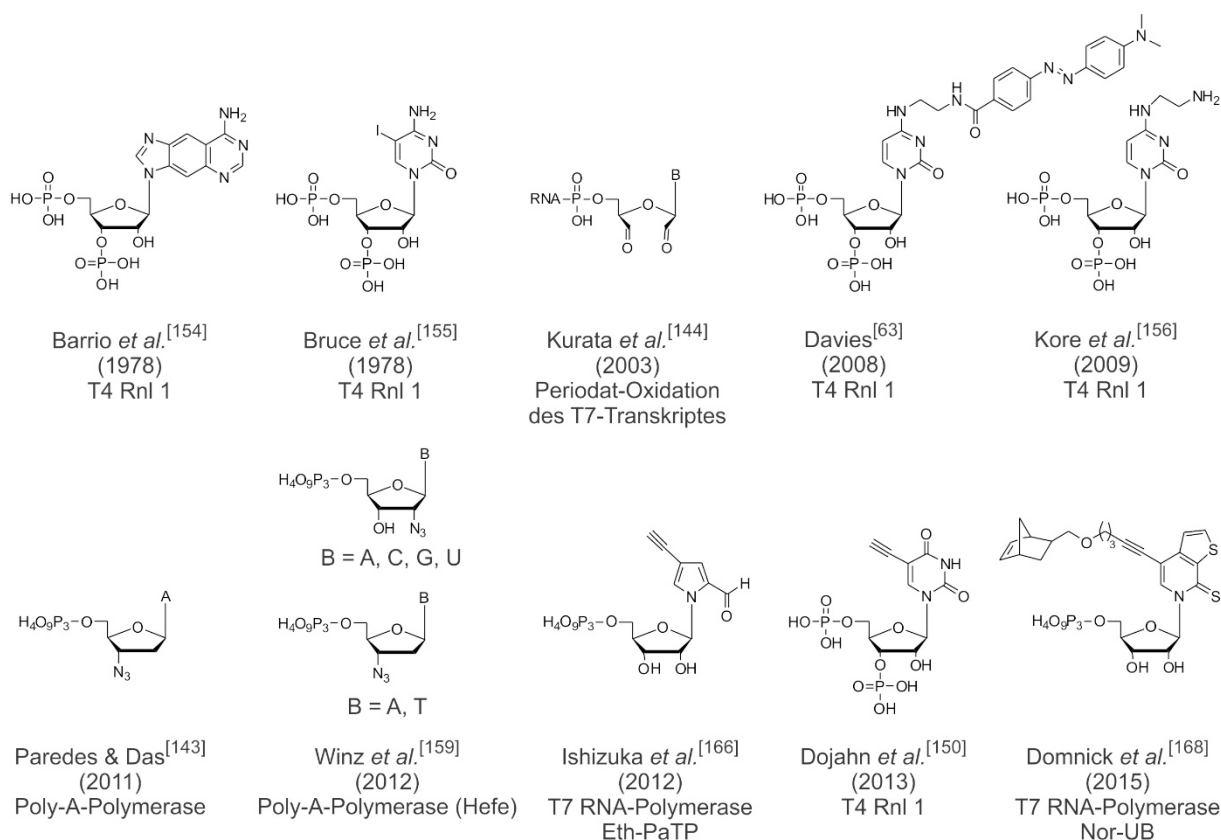


Abb. 2.6.2: Funktionalisierte Nukleotid-Bausteine zur post-synthetischen Modifizierung von RNA am 3'-Terminus oder zur internen Modifizierung während der Transkription. Et-PaTP: Ethinyl-Pyrol-2-carbaldehyd(Pa)-Triphosphat. Nor-UB TP: Norbornen-tragende unnatürliche Base Triphosphat. T4 Rnl 1: T4-RNA-Ligase-1.

Ein weiteres häufig genutztes Enzym zur 3'-Modifizierung an RNA ist die Poly-A-Polymerase, wie sie z. B. von Paredes & Das^[143] zum Einbau von 3'-Azido-2',3'-Dideoxy-Adenosin-Triphosphaten verwendet wurde. Die resultierende Azido-modifizierte RNA wurde in der templatgesteuerten Click-Reaktion zusammen mit einer entsprechenden synthetisch hergestellten 5'-Alkin-modifizierten RNA zur Generierung eines Ribozyms eingesetzt. Die Autoren nutzen dabei für den Alkin-Einbau jedweder Art die Festphasensynthese mit Propargyl-modifizierten Nukleotiden und für den Azid-Einbau am 5'-oder 3'-Terminus eine enzymatische Methode, entsprechend mit T7-RNA-Polymerase oder Poly-A-Polymerase. Grund dafür ist die größere Instabilität von Azido-Gruppen unter den Bedingungen der Festphasensynthese.^[158]

Winz *et al.*^[159] zeigten, dass Poly-A-Polymerase (aus der Hefe) modifizierte A-, C-, G- und U-Nukleotide einbauen kann, wobei alle vier 2'-Azido-3'-dNTPs gegenüber 3'-Azido-2',3'-ddNTP (N = T oder A) mit deutlich höherer Effizienz inkorporiert wurden. Für 2'-Azido-modifizierte dNTPs wurde ein Ein- und Mehrfacheinbau beobachtet. In der gleichen Arbeit konnte eine Strategie zum internen Labeling entwickelt werden: Dafür wurde an die freie 3'-OH-Position einer RNA mit der eingeführten 2'-Azido-Modifizierung ein weiteres RNA-Stück ligiert. Dies geschah mit Hilfe eines DNA-Splints und der RNA-Ligase 2, gefolgt von DNase-I-Verdau zur Entfernung des Splints. Anschließendes Labeling

mit einem Fluorophor-Derivat erfolgte über Click-Reaktionen, wie CuAAC oder spannungskontrollierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).

Der Frage nach der Bevorzugung von Poly-A-Polymerase oder T4-RNA-Ligase-1 zur Modifizierung am 3'-Terminus wurde in einer Arbeit von Ligner & Keller^[160] nachgegangen. Demnach bestand eine Substrat-Präferenz der Polymerase zu längeren RNA-Molekülen und der Ligase zu kürzerer RNA, die jedoch in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur zu betrachten ist, weshalb eine empirische Untersuchung für jede individuelle Sequenz empfohlen wurde.

Eine weitere Methode zur Funktionalisierung von RNA am 3', 5'-Terminus oder ortsspezifisch intern wird durch die Verwendung von Methyltransferasen ermöglicht (Abb. 2.6.3). Einige natürlich vorkommende sowie modifizierte Methyltransferasen sind neben dem Methyltransfer von S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) auch in der Lage, Funktionalitäten nichtnatürlicher AdoMet-Analoga auf ein spezifisches RNA-Substrat zu übertragen. Unter Verwendung von *in vitro* rekonstituierter *box C/D small ribonucleoprotein RNA 2'-O-methyltransferase* gelang der Gruppe um Klimasauskas eine spezifische Funktionalisierung von RNA mit einer Propargyl-Gruppe an jeweils verschiedenen Positionen.^[161] Die Selektivität der genannten Methyltransferase wurde durch die verwendete Guide-RNA bestimmt, die einen festen Bestandteil des aktiven C/D-Ribonukleoprotein-Komplexes darstellt. Um eine Substrat-RNA spezifisch an verschiedenen Positionen zu modifizieren, wurde die Lage der charakteristischen, konservierten Erkennungssequenz innerhalb der Guide-RNA verändert, was zu einer Verschiebung der Transferposition innerhalb der Substrat-RNA führte. In einer weiteren Arbeit derselben Gruppe wurde die in Pflanzen vorkommende HEN1 RNA-2'-O-Methyltransferase zur Funktionalisierung von doppelsträngiger siRNA und miRNA am 3'-Terminus verwendet (Abb. 2.6.3).^[162] Mit Hilfe funktionalisierter AdoMet-Analoga gelang die Übertragung terminaler Alkin-, Amino- und Biotingruppen auf die 2'-O-Positionen der 3'-Enden der Duplex-RNA. Die Alkin- und Amino-Funktionalisierung ermöglichte ein Labeling mit Fluorophoren über CuAAC oder NHS-Ester-Chemie.

Über die Verwendung der 5'-Cap-Struktur an eukaryotischer mRNA entwickelten Schulz *et al.*^[163] eine auf AdoMet-Analoga basierende Methode zur Modifizierung von RNA am 5'-Terminus (Abb. 2.6.3). Zur gezielten Reaktion am 5'-Cap einer RNA wurde die Trimethylguanosin-Synthase (Tgs) verwendet. Dafür wurde eine durch genetische Rekombination hergestellte Variante dieser Methyltransferase genutzt, um eine gesteigerte Reaktivität mit funktionalisierten AdoMet-Analoga zu erhalten. Mit Hilfe dieser Tgs-Variante konnten Alkin- und Alken-AdoMet-Analoga der Funktionalisierung der N2-Position der 5'-Cap-Struktur dienen. Eine anschließende Modifizierung mit Fluorophoren wurde durch CuAAC oder Thiol-En-Clickchemie erreicht. Die Gruppe um Rentmeister erweiterte ihren Ansatz des Cap-Labelings, indem auch Azido- und 4-Vinylbenzyl-Gruppen transferiert und die nachfolgende Labeling-Reaktion um bioorthogonale Methoden wie SPAAC, IEDDA und Photoclick-Chemie erweitert wurde (Abb. 2.6.3).^[164, 165]

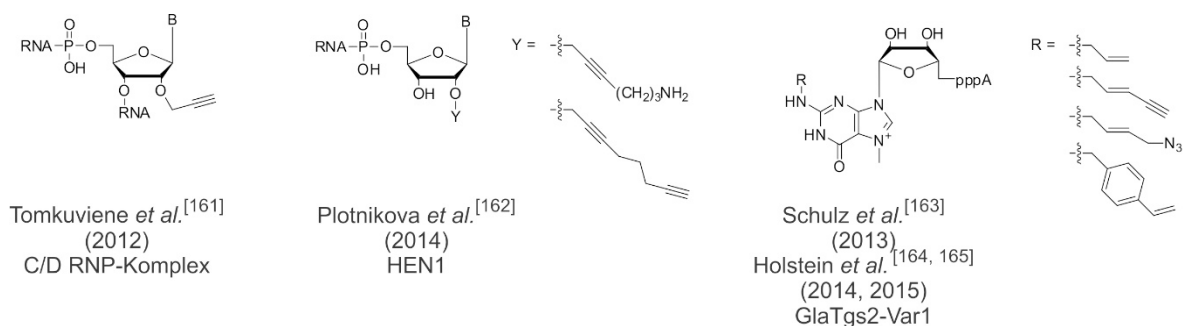


Abb. 2.6.3: Funktionalisierte Nukleotid-Bausteine zur post-synthetischen Modifizierung von RNA zum internen Labeling (links), am 3'-Terminus (mittig) und am 5'-Cap (rechts). Die Funktionalisierung erfolgt über Methyltransferasen und AdoMet-Analoga. C/D RNP-Komplex: box C/D Ribonukleoprotein-Komplex, HEN1: 2'-O-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*, GlaTgs2-Var1: *Giardia lamblia* Trimethylguanosin-Synthase-Variante-1.

Eine andere Modifizierungstechnik zum lokal spezifischen, internen Labeling von RNA wurde von Ishizuka *et al.*^[166] entwickelt, indem die Komplementarität unnatürlicher Basenpaare in der T7-*in-vitro*-Transkription genutzt wurde. Über chemische Synthese konnten die dafür benötigten DNA-Template unter Einbau der unnatürlichen Base 7-(2-Thienyl)imidazol-[4,5-b]pyridin (Ds) an gewünschter Position ausgestattet und unter Verwendung des korrespondierenden Basenpartners 2-Nitro-4-propinylpyrrol (Px) mit Hilfe von PCR-Amplifizierung vervielfältigt werden. Die anschließende T7-Transkription zu Alkin-modifizierter RNA erfolgte durch die Zugabe von Nukleotiden mit der zu Ds komplementären, Ethinyl-modifizierten Base Pyrrol-2-carbaldehyd (Pa, Abb. 2.6.2). Eine posttranskriptionelle Reaktion der eingebauten Alkin-Gruppe erfolgte über CuAAC mit Azido-modifiziertem Fluorophor oder Biotin.

In der Gruppe um Kath-Schorr wurden ebenfalls unnatürliche Basenpaare verwendet, um eine lokal spezifische, interne Modifizierung via T7-Transkription mit posttranskriptionellem Labeling vorzunehmen. Basierend auf Untersuchungen der Gruppe um Romesberg^[167] generierten Domnick *et al.*^[168] das unnatürliche Basenpaar Nor-UB/dNaM mit einer Norbornen- bzw. 2-Methoxynaphthalin-Einheit. In ein DNA-Templat wurde an gewünschter Stelle ein dNaM eingebaut, wodurch während der Transkription an entsprechender Position eine der Basenpaarung folgende Modifizierung mit Nor-UB-Triphosphaten erfolgte (Abb. 2.6.2). Über diesen Baustein mit Norbornen-Einheit wurde nach der Transkription die Einführung einer Tetrazin-modifizierten Fluorophor- oder Biotin-Einheit via IEDDA ermöglicht.

2.7 Click-Chemie und ihre Nutzung für bioorthogonales Labeling

Für die Herstellung modifizierter RNA ist zumeist der synthetische oder enzymatische Einbau von funktionalisierten Nukleotiden notwendig, der ortsspezifisch oder ortsunspezifisch erfolgen kann. Diese Funktionalisierung beinhaltet entweder eine gewünschte Eigenschaft wie Fluoreszenz oder eine unter bestimmten Bedingungen reaktive funktionelle Gruppe. Die letztgenannte Variante ermöglicht die post-

synthetische oder post-enzymatische Modifizierung von RNA mit verschiedenen Bausteinen wie Fluorophoren, Biotin, Kohlenhydraten oder Lipiden, die über eine Funktionalisierung mit Hilfe der Click-Chemie eingebaut werden können.^[169] Eine Möglichkeit zur Nutzung von RNA-Labeling-Techniken, die auf Click-Reaktionen basieren, ist die Verwendung zum intrazellulären, fluorogenen Labeling von RNA und ihrer mikroskopischen Untersuchung.

Click-Reaktionen sind ein geeignetes Mittel zur Modifizierung bzw. zum Labeln von RNA. Vorteilhaft ist, dass sie im Allgemeinen unter milden Bedingungen im wässrigen Medium durchgeführt werden können, schnell ablaufen, hohe Ausbeuten liefern und eine Vielzahl an Molekülen z. B. an eine RNA gebunden werden kann. Der Begriff der „Click-Chemie“ wurde im Jahr 2001 von der Gruppe um Sharpless^[170] eingeführt und beschreibt eine Reihe ausgewählter, leistungsstarker, jedoch unter einfachen Bedingungen ablaufender Synthesestrategien, mit denen eine breite Anwendung ermöglicht werden soll. Die Autoren definierten die Vorteile der Click-Chemie klar: Modulare Anwendbarkeit, hohe Ausbeuten und möglichst geringe oder gut abtrennbare Nebenprodukte sind nur einige der Kriterien, die von einer Reaktion erfüllt werden sollen, um als Click-Chemie bezeichnet werden zu können.

Eine beliebte Methode des RNA-Labelings ist die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC), die von Rostovtsev *et al.*^[171] basierend auf der Huisgen-Cycloaddition entwickelt wurde. Die Autoren erkannten, dass Kupfer-I-Salze in der Cycloaddition eine regioselektive Wirkung in Richtung 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole gegenüber den 1,5-Regioisomeren besitzen. Jedoch erst seit der Verwendung kupferstabilisierender Liganden, die das Auftreten von RNA-Strangbrüchen verhindern und gleichzeitig die katalytische Aktivität von Cu I verstärken, wurde die Anwendung für RNA-Modifizierungsreaktionen attraktiv.^[143] Häufig verwendete Liganden sind TBTA^[172] und THPTA^[173], wobei letzterer durch seine Wasserlöslichkeit vorteilhafter für die Anwendung in biologischen Systemen *in vitro* ist. Die genannten Liganden stabilisieren den oxidativen Cu-I-Zustand über ihre 1,2,3-Triazol-einheit durch Komplexbildung und minimieren dadurch radikalbildende Nebenreaktionen.^[172] Die tertiären Amine bewirken eine Verstärkung der Elektronendichte am Metall und beschleunigen damit die CuAAC.^[172] Trotz ihrer verbreiteten Nutzung zum Labeling von RNA ist die CuAAC aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der Cu-(I)-Ionen auf Anwendungen außerhalb lebender Zellen beschränkt.^[174] Verschiedene Arbeiten zeigen die Möglichkeit der RNA-Modifizierung *in cellulo* über Inkorporierung von Alkin- oder Azid-modifizierten Nukleobausteinen, die innerhalb der Zellen während der Transkription in RNA eingebaut werden kann.^[140-142] Die anschließende Nutzung der Cu-(I)-basierenden Click-Chemie für lebende Systeme beinhaltet jedoch eine vorhergehende Zell-Fixierung. Damit konnte die CuAAC zwar zum RNA-Labeling mit Fluorophoren für die Anwendung bildgebender Methoden genutzt werden, jedoch beschränkte sich dieses Abbild auf eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Fixierung.

Weitere RNA-kompatible Click-Reaktionen sind die spannungskontrollierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)^[159], die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA)^[149] und die

Staudinger-Ligation^[175]. Vorteilhaft an diesen Reaktionen ist die kupferfreie Click-Chemie, welche besonders für SPAAC und IEDDA die Anwendung in lebenden Zellen erlaubt, wie es für Protein-Labeling bereits gezeigt wurde.^[176, 177] Zu den bioorthogonalen Clickreaktionen, die in lebenden Zellen ohne Beeinträchtigung der zellulären Prozesse verlaufen können, zählen ebenfalls die Photoclick-Reaktion^[178] und kupferfreies Sonogashira *Cross-Coupling*^[179]. Mit diesen Reaktionstypen gelang das Labeling von Proteinen in lebenden eukaryotischen bzw. prokaryotischen Zellen.

Ein ortsspezifisches RNA-Labeling in lebenden Zellen wurde von der Gruppe um Kath-Schorr unter Verwendung der IEDDA erfolgreich durchgeführt.^[180] Dabei erfolgte die Einbringung einer synthetisch hergestellten Norbornen-modifizierten siRNA durch Transfektion. Nach anschließenden Waschschritten wurden die Zellen mit einem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat inkubiert und im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Gegensatz zur CuAAC wurde damit ein kupferfreies Labeling ohne vorherige Fixierung der Zellen ermöglicht.

Unter Verwendung von SPAAC gelang Sawant *et al.*^[181] ebenfalls ein allgemeines zellinternes Labeling von RNA. Dazu wurden C5-Azido-modifizierte UTP-Bausteine in Zellen transfiziert, die während der Transkription in RNA-Transkripte eingebaut werden konnten. Vor der Inkubation mit dem Cyclooctin-Derivat mit Fluorophoreinheit zur Einleitung der kupferfreien SPAAC war jedoch eine Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 notwendig.

Kovalente RNA-Labeling-Techniken basierend auf Click-Chemie sind neben nicht-kovalenten Ansätzen wie FISH^[182], Molekularen Beacons^[183], FIT-Sonden^[184] und Aptameren^[185] eine Möglichkeit zum intrazellulären Labeling von RNA. Die Detektion einer spezifischen RNA durch Funktionalisierung mit anschließendem *in-vivo*-Labeling ist eine anspruchsvolle Aufgabe für die Anwendung in lebenden Zellen. Die größte Herausforderung stellt dabei die intrazelluläre Funktionalisierung einer spezifischen endogenen RNA mit anschließendem Labeling im lebenden System dar. Die Funktionalisierung einer spezifischen Ziel-RNA erfolgt deshalb zumeist chemo-enzymatisch *in vitro*, wonach diese über Transfektion oder Mikroinjektion in die Zellen überführt werden können. Eine anschließende Modifizierung mit einem geeigneten funktionalisierten Fluorophor über die entsprechende bioorthogonale Clickreaktion ermöglicht die Visualisierung der inkorporierten RNA. Zur Visualisierung von zellulär transkribierter RNA können funktionalisierte Nukleobausteine in die Zellen überführt werden, die anschließend von den zellulär vorhandenen Polymerasen in neue RNA-Transkripte eingebaut werden. Das anschließende fluorogene Labeling resultiert jedoch in einem allgemeinen Labeling jedweder zellulärer RNA. Eine mögliche Alternative zum Labeling von RNA-Gruppen wie der mRNA oder spezifischer RNA-Sequenzen stellt die Verwendung von Methyltransferasen dar. Jedoch wird für diese Methode zumeist eine potente, biotechnologisch veränderte Enzymvariante benötigt, die den zu untersuchenden Zellen ebenso zugänglich gemacht werden muss wie die funktionalisierten AdoMet-Analoga.^[186]

3 ZIELSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener Ansätze zur Untersuchung nicht-codierender RNAs, speziell von pre-miRNAs und miRNAs sowie circRNAs. Dabei wurden drei unterschiedliche Ziele formuliert: (1) Die Herstellung und Funktionalisierung von circRNA mit CuAAC zur Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern und Wirkmechanismen. (2) Die Modifizierung der pre-miRNA pre-miR-134 mit einem Fluorophor/Quencher-Paar zur Visualisierung und Lokalisierung der miRNA-Reifung in Neuronen *in cellulo*. (3) Die Etablierung eines BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays zur Identifizierung potentieller Inhibitoren dieses posttranskriptionellen Regulationsmechanismus unter Beteiligung von miR-122.

Die erste Zielsetzung baute auf vorhergehende Arbeiten auf, die sich bereits mit der Etablierung chemo-enzymatischer Methoden zu Modifizierung von RNA befassen. Dabei gelang beispielsweise die 5'-terminale Funktionalisierung an pre-miRNA über die Inkorporierung eines chemisch Alkin-modifizierten Nukleobausteins auf Basis von *in-vitro*-Transkription.^[150] Diese Technik wurde von Dojahn *et al.*^[150] ebenfalls zur 3'-terminalen Funktionalisierung über die Einführung eines an der Nukleobase funktionalisierten Mononukleotidbausteins verwendet. Darüber hinaus sollte in der vorliegenden Arbeit eine Erweiterung der bisher verwendeten chemo-enzymatischen Methoden hinsichtlich einer universellen Einsetzbarkeit demonstriert werden. Dabei stand der Einsatz der etablierten Methoden für andere als die bisher verwendeten pre-miRNAs im Vordergrund. Zu diesem Zweck sollte die circRNA CRKL mit einer Größe von ca. 450 nt verwendet werden, die im gleichen Genabschnitt codiert wird wie ein Onkogen, welches in Zusammenhang mit Lungenkrebs steht.^[187] Es sollte gezeigt werden, dass auch die in ihrer Basenzahl wesentlich größeren circRNAs durch Anpassung und Weiterentwicklung der bekannten Methoden funktionalisiert werden können. Vor der reinen Funktionalisierung der circRNA wurde zunächst ihre Zyklisierung durch Click-RNA-Ligation angestrebt. Die dafür notwendigen Modifizierungen am 3'- und 5'-Terminus eines linearen circRNA-Templates sollten über Alkin- und Azid-Einheiten realisiert werden (Abb. 3.1). Zu diesem Zweck wurden funktionalisierte Nukleobausteine entwickelt, die sich zu den bisher verwendeten durch Position und Art der Funktionalisierung unterschieden. Für den terminalen Einbau wurden jeweils ein 5'-Azido- und ein 3'-Alkin-funktionalisierter Mononukleotid-Baustein angedacht.

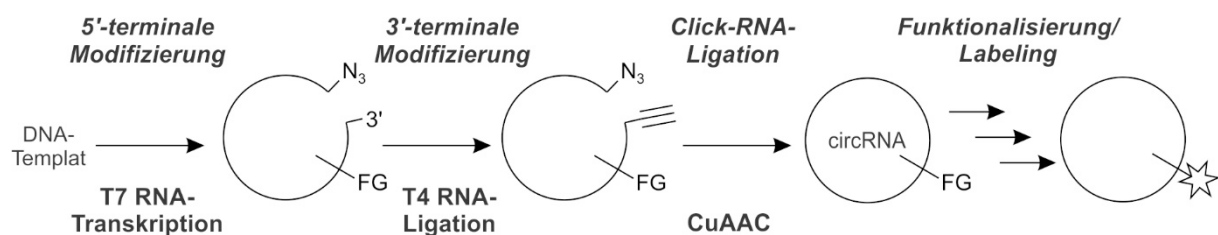


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Generierung funktionalisierter circRNA. Chemo-enzymatische Modifizierung ermöglicht die Zyklisierung durch Click-Chemie (Click-RNA-Ligation) und bietet durch den

Einbau einer funktionellen Gruppe (FG) die Option auf eine weitere, individuelle Funktionalisierung wie Biotin oder ein Fluorophor (symbolisch durch einen Stern dargestellt).

Die zweite Zielsetzung zur Untersuchung nicht-codierender RNAs sollte die Verwendung von chemoenzymatisch modifizierten pre-miRNAs für zelluläre Experimente im Bereich der miRNA-Reifung demonstrieren. Grundlage bildete ein von Davies *et al.*^[93] bereits etablierter fluoreszenz-basierender miRNA-*in-vitro*-Reifungsassay, der für die Identifizierung potentieller Inhibitoren der miRNA-Reifung genutzt wurde. Darauf aufbauend sollte in der vorliegenden Arbeit die dual Fluorophor/Quencher-gelabelte pre-miR-134 entwickelt werden, um *in cellulo* die Lokalisierung des miRNA-Reifungsortes innerhalb von Neuronen zu ermöglichen (Abb. 3.2). Die Bedeutung gehirnspezifischer miRNAs wie der miR-134 liegt im Allgemeinen in der Regulierung von Entwicklung, Differenzierung und Funktion des Nervensystems. Im Speziellen gehört miR-134 zu einer Gruppe neuronaler miRNAs, die an der Regulierung der synaptischen Proteinsynthese und der synaptischen Plastizität in den Dendriten beteiligt sind.^[135, 188] Eine zentrale Fragestellung dabei ist, ob die Reifung der miR-134 auch direkt in den Dendriten aus dort vorgefundener pre-miR-134 stattfinden kann.^[135]

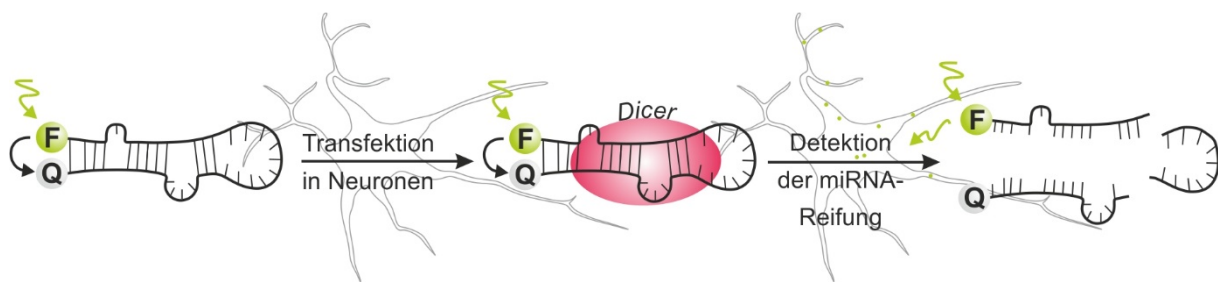


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Verwendung von dual gelabelter pre-miR-134 als Sonde in Neuronen zur Lokalisierung der miRNA-Reifung innerhalb einer Zelle. F: Fluorophor. Q: Quencher.

Die dritte Zielsetzung, die nicht-codierende RNAs in Form von miRNA und ihre Beteiligung an posttranskriptionellen Regulationsmechanismen beinhaltet, umfasste die Etablierung eines Testsystems zur Identifizierung potentieller Inhibitoren der mRNA-Spaltung durch den Ago2/miRNA-Komplex, auch *minimal RISC* genannt.^[74] Zu diesem Zweck sollte die *branched rolling-circle amplification* (BRCA) als eine einfache und zuverlässige Detektionsmethode verwendet werden (Abb. 3.3). Im Gegensatz zu der für die Ago2-vermittelte Spaltung häufig verwendeten Analyse via PAGE lagen die Vorteile in der Möglichkeit der gleichzeitigen Untersuchung vieler Testsubstanzen als Inhibitor-Screening und der Verwendung einer labelfreien Umgebung. Der zu etablierende BRCA-basierende Ago2-vermittelte Spaltungs-assay sollte auf Basis der RISC-Formierung von rekombinantem, humanem Ago2 und der miR-122 entwickelt werden. Die miR-122 ist die am weitesten häufigsten vorkommende miRNA in der Leber und damit ein attraktives Target in der Entwicklung neuer Wirkstoffe, da sie sowohl an der Hepatitis-C-Erkrankung wie auch Krebserkrankungen der Leber beteiligt ist.^[189]

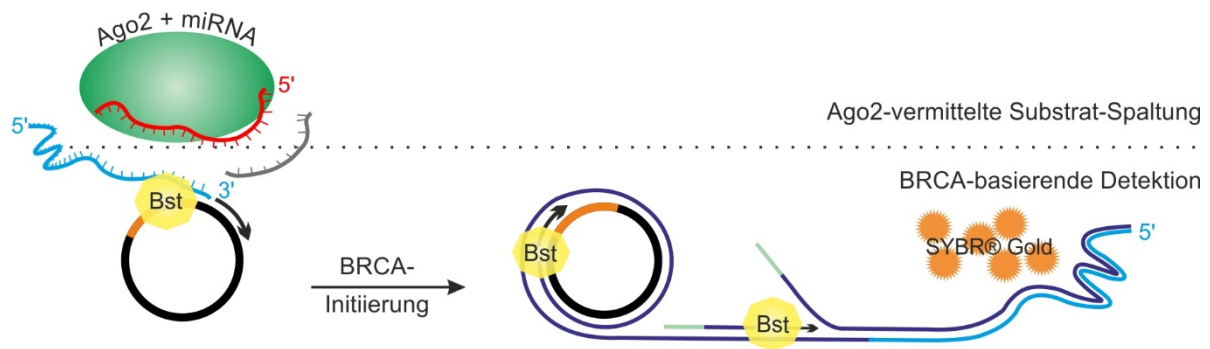


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays. Der obere Teil repräsentiert den Schritt der Substratspaltung, der untere Teil zeigt den BRCA-basierenden Detektionsschritt. Bst: Bst DNA-Polymerase (*Large Fragment*). BRCA: *branched rolling-circle amplification*. Ago2: Argonaut 2.

Die Entwicklung neuer Verfahren zur Aufklärung von Funktion und Wirkung nicht-codierender RNAs stellt einen wesentlichen Schritt für das Verständnis ihrer Beteiligung an der humanen Physiologie und Pathologie dar. Am Beispiel der Rolle von miRNAs in der posttranskriptionellen Genregulation und den Auswirkungen auf den Organismus bei ihrer abnormalen Expression in Form von Krankheiten wird auch die Bedeutung nicht-codierender RNAs in der Entwicklung neuer Diagnose- und Therapieansätze deutlich. Durch das zunehmende Verständnis der Zusammenhänge zwischen einer bestimmten Erkrankung und dem zugrundeliegenden, spezifischen miRNA-Expressionsmuster, können sowohl konkretere Diagnosen als auch individuellere Therapien für eine möglichst effektive Bekämpfung von Krankheiten geschaffen werden. Die hier vorliegende Arbeit soll einen kleinen Teil zur Etablierung neuer Methoden im Bereich nicht-codierender RNAs beitragen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Chemo-enzymatische Methoden zur Zyklisierung von RNA

Die Click-Chemie ist ein vielseitig einsetzbares Mittel zur Modifizierung von RNA (Abschnitt 2.7). Mit ihrer Hilfe kann ein RNA-Strang mit verschiedensten Funktionen ausgestattet werden. Dies kann über Nukleotidbausteine mit geeigneten reaktiven/funktionellen Gruppen realisiert werden, die zuvor in den RNA-Strang an der gewünschten Position eingebaut wurden. Neben der Funktionalisierung von RNA mit Fluorophoren und anderen Gruppen wie Biotin, ist die Zyklisierung von RNA eine weitere interessante Reaktionsmöglichkeit. Die nicht-codierenden circRNAs sind wesentlich größer als miRNAs und allein durch ihre Größe über chemische Synthesemethoden schwer zugänglich.

Für die Generierung einschließlich Zyklisierung von funktionalisierten circRNAs wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus enzymatischen Synthesemethoden und Click-Chemie als ein möglicher adäquater Ansatz in Betracht gezogen. Zu diesem Zweck wurde die circRNA CRKL mit einer Länge von ca. 450 nt verwendet. Ziel dabei war die Funktionalisierung der 3'- und 5'-Termini eines linearen CRKL-Transkriptes mit reaktiven Gruppen. Über den Einbau modifizierter Nukleotidbausteine mit je einer Azido- und einer Alkynylgruppe an den Termini sollte anschließend der Ringschluss über CuAAC ermöglicht werden (Abb. 4.1.1).

Die humane circRNA CRKL kann durch das Backsplicing und die Zyklisierung eines Exons des CRKL-pre-mRNA-Transkriptes gebildet werden.^[190] Die Biogenese erfolgt dabei co-transkriptionell bzw. kompetitiv zum Splicing aus der pre-mRNA des CRKL-Onkogens.^[187, 190] Von der Arbeitsgruppe um Prof. Nikolaus Rajewsky wurde dem Arbeitskreis Arenz ein Plasmid mit der Sequenz für CRKL zur Generierung des linearen CRKL-RNA-Transkriptes über T7-*in-vitro*-Transkription zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen und der Modifizierungen an den Termini wurden verschiedene kürzere RNA-Transkripte verwendet. Für die Modifizierung am 3'-Terminus durch Ligation mit der T4-RNA-Ligase-1 wurden Transkripte unterschiedlicher Größe und Sekundärstruktur verwendet, um deren Einfluss auf die Ligation eines modifizierten Nukleotides zu untersuchen. Für die Modifizierung am 5'-Terminus wurde ein verkürztes CRKL-Templat entwickelt. Das resultierende 43 nt große Transkript hatte eine der CRKL-RNA analoge Sequenz im Bereich der Termini einschließlich der geöffneten Haarnadelstruktur, wurde jedoch um ca. 400 nt verkürzt (Abb. 4.1.2). Damit sollte gewährleistet werden, dass der Einbau eines modifizierten Starter-Gs für das verkürzte CRKLsh unter gleichen Bedingungen, also mit gleicher Sequenz im Startbereich der Transkription am 5'-Terminus, abläuft wie mit dem perspektivisch zu verwendenden offenen, 450 nt großen CRKL-Transkript.

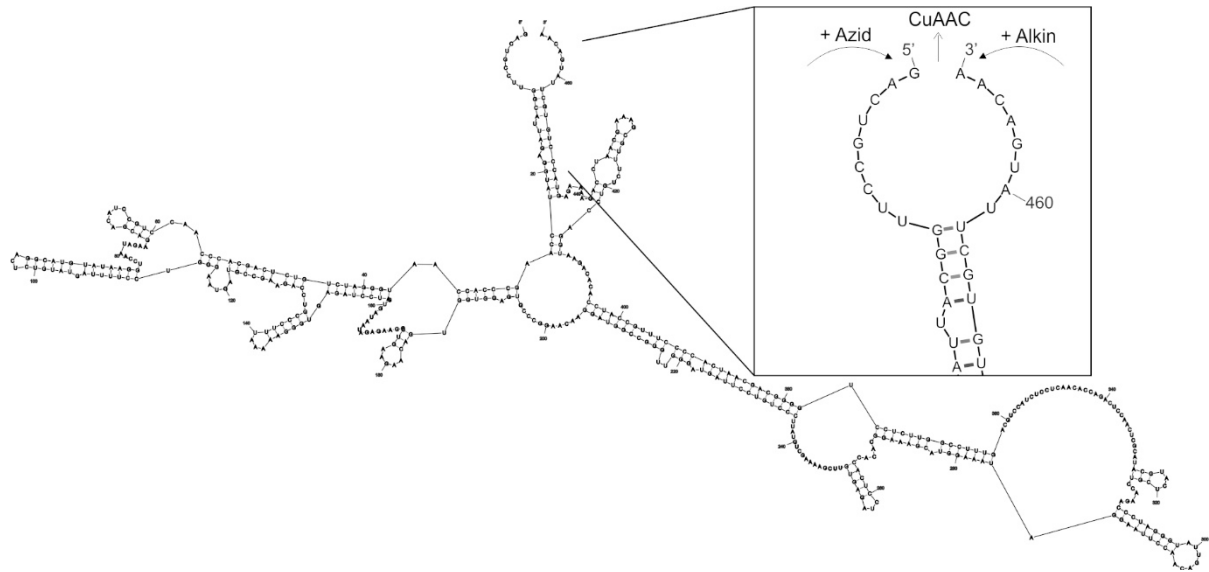


Abb. 4.1.1: Schematische Darstellung der Sequenz von circRNA CRKL nach T7-Transkription. Das dsDNA-Templat wurde durch PCR von einem Plasmid mit der Sequenz für CRKL generiert. Der vergrößerte Teil zeigt die Termini als offenen Haarnadel-Bereich, welche für chemo-enzymatische Modifizierung und Ringschluss zur Verfügung stehen. Erstellung der Sekundärstruktur: *RNA Folding Form* von *The mfold Web Server*.^[191]

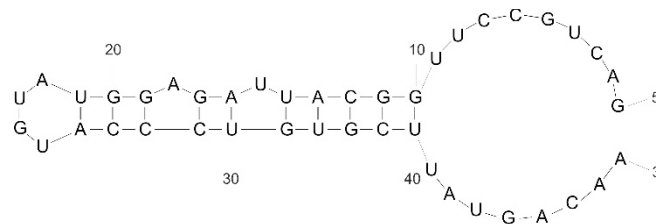


Abb. 4.1.2: Verkürztes RNA-Transkript CRKLsh in Analogie zum Voll-Längen-Transkript CRKL. Die Termini besitzen dieselbe Haarnadelstruktur und die gleiche Sequenz wie CRKL. Die Erstellung der Sekundärstruktur erfolgte mit dem *RNA Folding Form* von *The mfold Web Server*.^[191]

4.1.1 Modifizierung am 3'-Ende durch Ligation

Für die Zyklisierungsreaktion mit RNA über CuAAC wurde im Arbeitskreis Arenz von C. Kimmich der Nukleotidbaustein 5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin (pU_{Prg}) synthetisiert, der sich gegenüber des ebenfalls im Arbeitskreis entwickelten Bausteines 3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethinyluridin (pU^{Alk}) durch die Position der Alkynylgruppe unterscheidet (Abb. 4.1.3). Die Positionierung der Propargyl-Gruppe an Stelle der 3'-OH-Gruppe wurde gewählt, um eine spätere Zyklisierung zwischen 3'- und 5'-Terminus über eine biokompatible Triazol-Verbindung zu ermöglichen, wie es bereits an DNA-Templaten gezeigt wurde.^[192]

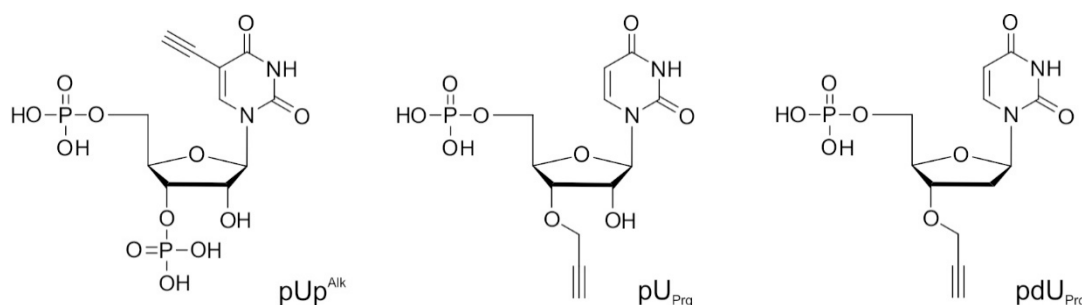


Abb. 4.1.3: Verwendete Bausteine zur Modifizierung von RNA am 3'-Terminus über Ligation mit T4-RNA-Ligase-1. pU^{Alk} : 3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethinyluridin. pU_{Prg} : 5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin. pdU_{Prg} : 2'-Desoxy-5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin.

Da der Nukleotidbaustein pU^{Alk} (Abb. 4.1.3) bereits erfolgreich am RNA-3'-Terminus über enzymatische Ligation eingebaut werden konnte,^[150] wurde dieser zu Vergleichszwecken und zur Etablierung der Reaktionsbedingungen neben dem 3'-O-propargylierten pU_{Prg} an RNA-Template verschiedener Größe und Sequenz ligiert. Die Ligation erfolgte mit der T4-RNA-Ligase-1, welche u. a. in der Lage ist, Mononukleotide an das 3'-Ende einer ssRNA zu ligieren. Einen weiteren, im Arbeitskreis Arenz von R. Harmel hergestellten Baustein stellte das 2'-desoxy- pU_{Prg} (pdU_{Prg}) dar. Aufgrund seiner fehlenden Hydroxylgruppe an der 2'-Position sollte untersucht werden, ob auch dieses Nukleotid von der verwendeten T4-Rnl1 eingebaut wird. Nach einer Ligationsreaktion erfolgte im Anschluss zur Überprüfung der Ligation jeweils eine Test-Clickreaktion mit einem Azid-Baustein. Für Analysezwecke wurde dafür ein Fluorophor verwendet, welches über PAGE und Anregung bei entsprechender Wellenlänge den Nukleotideinbau signalisieren sollte. Zur Etablierung der Reaktionsbedingungen wurden zunächst verschiedene RNA-Oligonukleotide mit den pU^{Alk} -Bausteinen ligiert und mit Hilfe der CuAAC mit einem Cy3-Azid und PAGE-Analyse visualisiert. Die Ligationsreaktion erfolgte an einem chemisch synthetisierten, kommerziell erworbenen 18-mer und einem 22-mer (miR-21). Außerdem wurden Oligomere aus Standard-T7-Transkriptionen mit unterschiedlicher Sekundärstruktur verwendet. Dabei handelte es sich um ein 30-mer, ein 50-mer (pre-miR-134_{short}), ein 60-mer (pre-miR-134-A) und zwei 59-mere entsprechend den pre-miRNAs pre-miR-21 und pre-miR-21c1. Nach der Ligation wurde das Reaktionsgemisch direkt in die Click-Reaktion eingesetzt, wobei der Volumenanteil des Ligationsansatzes nicht mehr als 50 % des CuAAC-

Reaktionsvolumens betrug. Für die Gel-Analyse wurden jeweils 2 µl des Click-Reaktionsansatzes aufgetragen. Die Gel-Analyse zeigte bei Anregung des Cy3-Fluorophors eine Übereinstimmung mit den verschiedenen RNA-Banden, wie sie nach *SYBR-Gold*-Färbung detektiert wurden (Abb. 4.1.4). Für jedes RNA-Templat konnte eine Ligation mit pUp^{Alk} festgestellt werden, jedoch unterschied sich die Intensität der Fluoreszenz unter ihnen, wobei keine Abhängigkeit von der RNA-Größe festgestellt wurde.

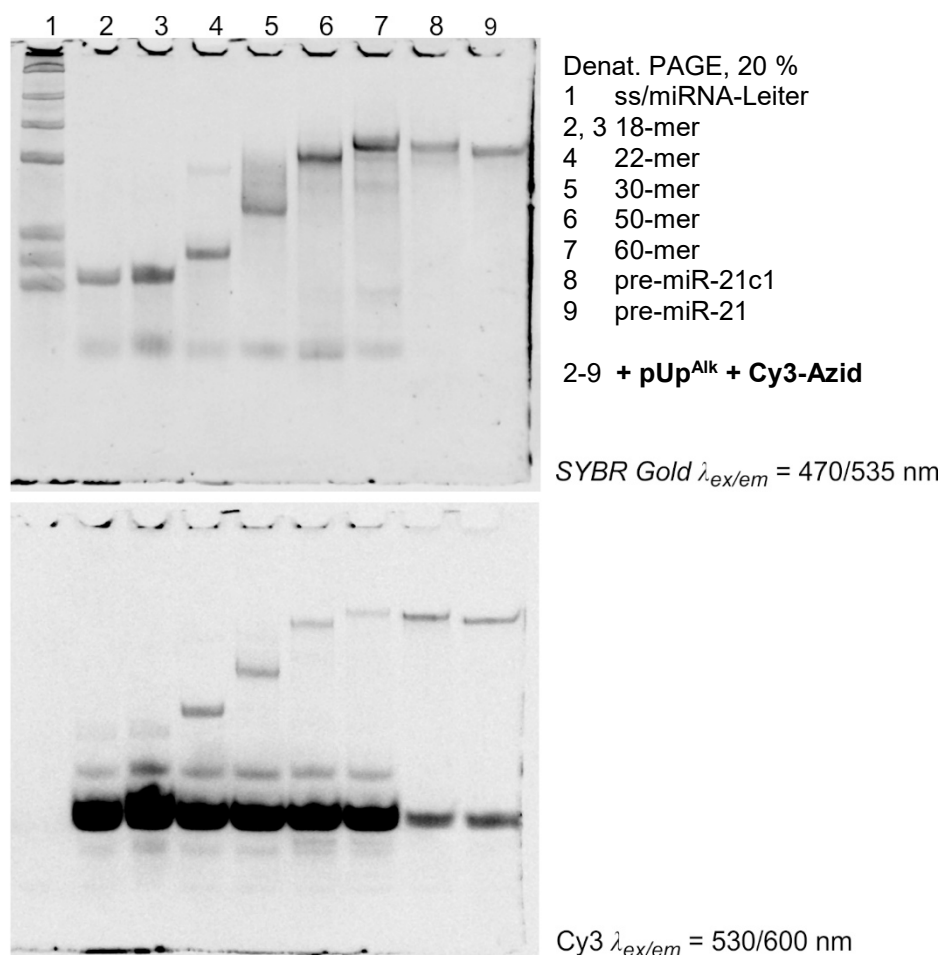


Abb. 4.1.4: Ligation von pUp^{Alk} an diverse RNA-Templates und anschließende CuAAC mit Cy3-Azid. Denaturierendes PA-Gel (20 %) mit RNA-Oligonukleotiden unterschiedlicher Größe nach der Ligation von pUp^{Alk} und anschließender Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid. oben: Gel nach Färbung mit *SYBR Gold*. unten: Gel vor Färbung mit *SYBR Gold* unter Cy3-Anregung.

Anschließend wurde die Ligation analog zu den mit pUp^{Alk} etablierten Reaktionsbedingungen mit pUp^{Prg} durchgeführt. Dafür wurden aus den Vorversuchen die drei RNA-Templates mit den stärksten Cy3-Fluoreszenzsignalen im Produkt gewählt. Nach der Ligation von pUp^{Prg} erfolgte wieder eine Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid und anschließende Auswertung via PAGE. Die Gel-Analyse erwies sich als schwierig, da nicht ligiertes pUp^{Prg}, welches in der CuAAC-Reaktion ebenfalls mit Cy3-Azid konjugierte, andere Laufeigenschaften zeigte als das analoge Konjugat mit pUp^{Alk} (Spur 2-7, Abb. 4.1.5). Dabei kam es zu einer Überlappung mit RNA-Banden, lediglich das 22-mer war zu erkennen. Deshalb erfolgten vor dem Auftragen auf das Gel eine Aufarbeitung des Reaktionsansatzes mit Amicon-Zentrifugenfiltern

sowie eine anschließende EtOH-Präzipitation. Die erneute Gel-Analyse zeigte ein Cy3-Fluoreszenz-Signal für alle drei RNAs in ähnlicher Intensität wie die Vergleichsreaktion mit pU^{Alk} (Spur 9-11, Abb. 4.1.5). Damit konnte gezeigt werden, dass eine Ligation von pU_{Prg} mit Hilfe der T4-RNA-Ligase-1 an ein RNA-Templat möglich war.

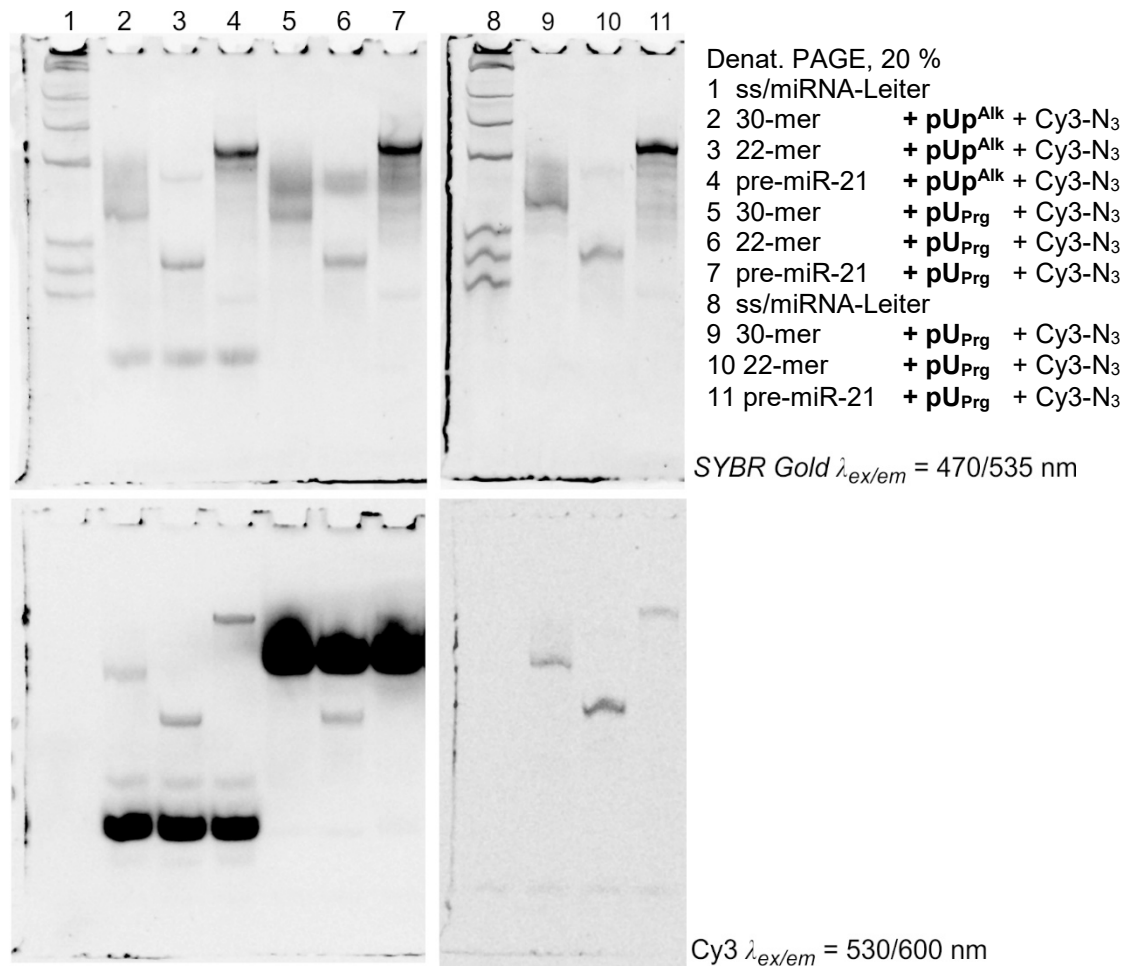


Abb. 4.1.5: Ligation von pU_{Prg} an verschiedene RNA-Templates und anschließende CuAAC mit Cy3-Azid. Denaturierende PA-Gele (20 %) mit RNA-Oligonukleotiden nach der Ligation von pU_{Prg} und anschließender Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid. oben: Gel nach Färbung mit SYBR Gold. unten: Gel vor Färbung mit SYBR Gold unter Cy3-Anregung. Spur: 2-4: Vergleich mit pU^{Alk} -Ligation. Spur 9-11 entspricht den Produkten 5-7 nach Aufarbeitung.

Ebenso wurde eine analoge Untersuchung der Ligation für pdU_{Prg} , welches keine 2'-OH-Gruppe besitzt, an den vorhergehend verwendeten drei RNA-Templaten durchgeführt. Nach der Ligation von pdU_{Prg} an ein 22-mer, 30-mer und an pre-miR-21 wurde ebenfalls eine Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid durchgeführt. Zur besseren Visualisierung und zum Vergleich mit der pU_{Prg} -Reaktion wurde nach der Ligation ebenfalls mit Amicon-Zentrifugenfiltern aufgearbeitet und mit EtOH gefällt, bevor die Ansätze auf ein PA-Gel aufgetragen wurden (Abb. 4.1.6). Im Gegensatz zu pU_{Prg} und zu pU^{Alk} wurde hier eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität beobachtet. Der Vergleich der pre-miR-21 in Spur 3 (Ligation mit pU_{Prg}) und Spur 4 (Ligation mit pdU_{Prg}) verdeutlichte, dass trotz der größeren RNA-Menge in Spur

4 die Cy3-Fluoreszenz schwächer als in Spur 3 ausfiel. Ebenso der Vergleich der Intensität einer mit pU^{Alk} ligierten RNA in Spur 8 zeigte dort eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität als in Spur 7.

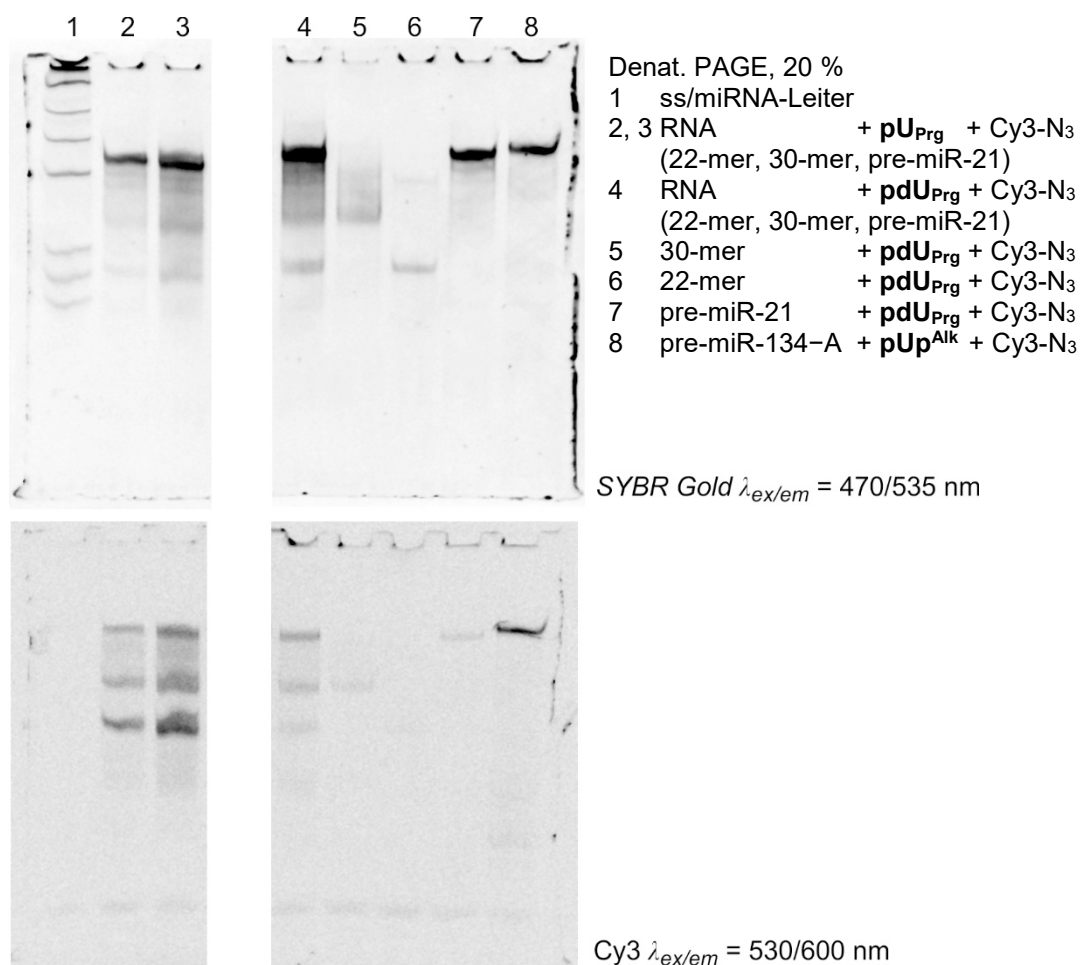


Abb. 4.1.6: Ligation von pdU_{Prg} an diverse RNA-Template und anschließende CuAAC mit Cy3-Azid. Denaturierendes PA-Gel (20 %) mit RNA-Oligonukleotiden unterschiedlicher Größe nach der Ligation von pdU_{Prg} im Vergleich zu pU_{Prg} und anschließender Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid. oben: Gel nach Färbung mit SYBR Gold. unten: Gel vor Färbung mit SYBR Gold unter Cy3-Anregung.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Ligation von pdU_{Prg} trotz fehlender 2'-OH-Gruppe an ein RNA-Templat mit der T4-RNA-Ligase-1 generell möglich war, jedoch geringere Ausbeuten zu erwarten sind. Da die Detektion auf Grundlage des an den Nukleotidbaustein über Click-Reaktion konjugierten Fluorophors vorgenommen wurde, kann nicht unterschieden werden, ob die Ligationsreaktion oder die Clickreaktion für die geringere Fluoreszenzintensität unter Verwendung von pdU_{Prg} verantwortlich ist. Da Click-Reaktionen wie die CuAAC jedoch routinemäßig auch für DNA-Modifizierungen eingesetzt werden, wurde vermutet, dass bei der Ligation weniger pdU_{Prg} als pU_{Prg} eingebaut wurde.

Nun sollte überprüft werden, wie sich ein bereits vorhandener Fluorophor am 5'-Terminus auf die 3'-Ligation auswirkt. Um zu prüfen, ob ein Fluorophor am 5'-Ende in hoher Proximität zum 3'-Ende das Labeling an dieser Stelle beeinträchtigt, wurde die mit Cy3 5'-gelabelte pre-miR-134-A (Cy3-pre-134) verwendet. Diese wurde mithilfe der T7-Transkription hergestellt und dabei ein modifiziertes Starter-G

über die *fed-batch*-Methode wie unter Abschnitt 4.2 beschrieben am 5'-Terminus eingebaut. Über CuAAC erfolgte der Einbau von Cy3 am 5'-Terminus. Nach der Clickreaktion wurde die Fluorophor-gelabelte RNA via HPLC aufgearbeitet um sicherzustellen, dass nur die Cy3-gelabelte pre-miRNA vorlag. Die so generierte pre-miRNA Cy3-pre-134 wurde neben der ungelabelten pre-miR-134 in die Ligationsreaktion eingesetzt. Neben dem Vergleich zwischen 5'-gelabelter und 5'-ungelabelter RNA sollte auch untersucht werden, ob die Nukleotide pUp^{Alk} und pUp_{PrG} unterschiedlich gut von der T4-RNA-Ligase-1 eingebaut werden. Zur Differenzierung der Signale wurde nach erfolgter Ligation am 3'-Terminus mit *Texas-Red*-Azid gelabelt. Zum Vergleich wurde die 5'-ungelabelte pre-miR-134 verwendet, indem diese mit pUp^{Alk} ligiert und mit Cy3-Azid bzw. *Texas-Red*-Azid konjugiert wurde. Die Auswertung des PA-Gels zeigte, dass sowohl pUp^{Alk} als auch pUp_{PrG} mit *Texas-Red* gelabelt an die verwendete Cy3-pre-134 ligiert wurden (Abb. 4.1.7). Der visuelle Vergleich von Spur 2 und Spur 3 mit den Reaktionsansätzen unter Verwendung je einer der beiden Nukleotidbausteine zeigte keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den beiden Bausteinen. Spur 5 belegte, dass Cy3 auf dem Gel mit der Anregungswellenlänge für *Texas-Red* keine Fluoreszenz zeigte (Pfeil, Abb. 4.1.7). Damit konnte sichergestellt werden, dass die Fluoreszenzsignale für *Texas-Red* in den Spuren 2, 3, 4, 6 und 7 nicht auf ein Cy3-Signal zurückzuführen waren. Eine Überlappung des Anregungsbereiches von Cy3 und *Texas-Red* konnte für die Anregungswellenlänge von Cy3 festgestellt werden (Spur 6, 7, Abb. 4.1.7), jedoch hatte dies keine Relevanz für die Auswertung, die sich auf die Bewertung der Ligation nach *Texas-Red*-Labeling bezog. Es konnte gezeigt werden, dass für eine 5'-gelabelte pre-miRNA unter Verwendung von pUp^{Alk} und pUp_{PrG} in der Ligation mit anschließender Test-Clickreaktion ein ähnliches 3'-Labeling-Ergebnis hervorgebracht wurde (Spur 2 und 3, Abb. 4.1.7). Auch im Vergleich zwischen 5'-gelabelter und 5'-ungelabelter pre-miR-134 konnte ein erfolgtes 3'-Labeling mit *Texas-Red* beobachtet werden (Spur 2/4 und 6/7, Abb. 4.1.7).

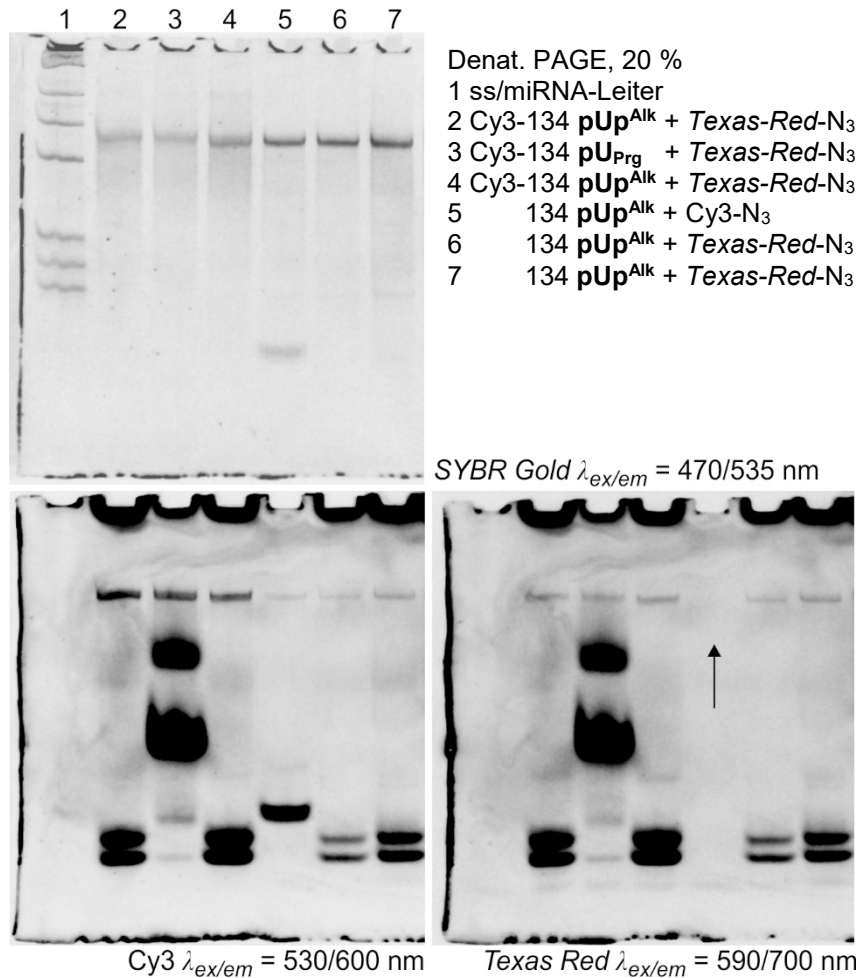


Abb. 4.1.7: Ligation von **pUp^{Alk}** und **pU_{Prg}** an 5'-Cy3-gelabelte pre-miR-134-A mit anschließender CuAAC mit *Texas-Red*- bzw. Cy3-Azid. Denaturierendes PA-Gel (20 %) nach der Ligation von **pU_{Prg}** und **pUp^{Alk}** an 5'-gelabelte und -nichtgelabelte pre-miR-134-A und anschließender Test-Clickreaktion mit Cy3- oder *Texas-Red*-Azid. oben: Gel nach Färbung mit SYBR Gold. unten: Gel vor Färbung mit SYBR Gold unter Cy3- bzw. *Texas-Red*-Anregung. Cy3-134: pre-miR-134-A.

4.1.2 Modifizierung am 5'-Ende über *in-vitro*-Transkription

Für die Zyklisierungsreaktion mit RNA über CuAAC wurde im Arbeitskreis Arenz von A. Klose-Stier der Nukleotidbaustein 5'-Azido-5'-Deoxyguanosin (Azido-G, N₃-G) synthetisiert, der als Starter-G in der *in-vitro*-Transkription diente (Abb. 4.1.8). Gegenüber des im Arbeitskreis herkömmlich verwendeten Bausteines O-(5'-Guanosin)-O-propargylmono-phosphat (Prg-pG, Abb. 4.1.8) unterschied er sich durch eine Azidogruppe, welche anstelle der Propargylgruppe einschließlich Phosphatgruppe positioniert war. Die Positionierung der Azido-Gruppe am 5'-Terminus wurde gewählt, um eine anschließende Zyklisierung zwischen 3'- und 5'-Terminus über eine biokompatible Triazol-Verbindung zu ermöglichen.

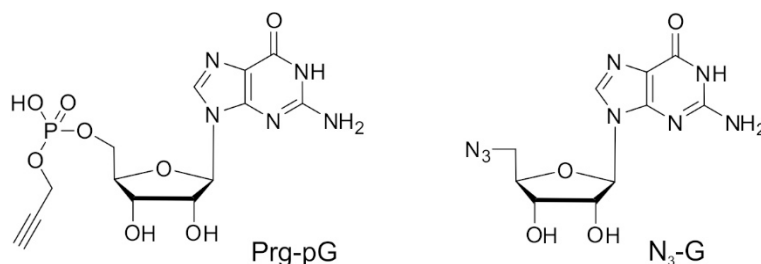
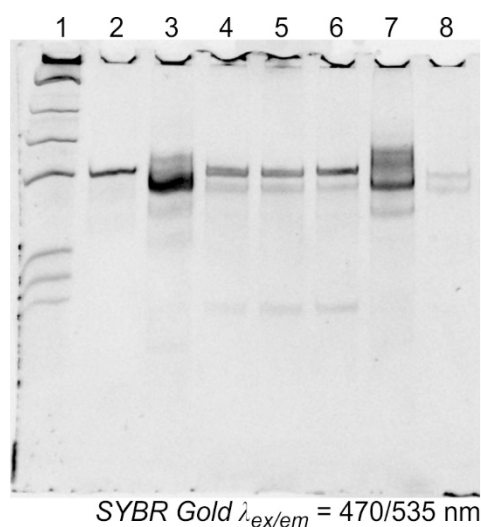
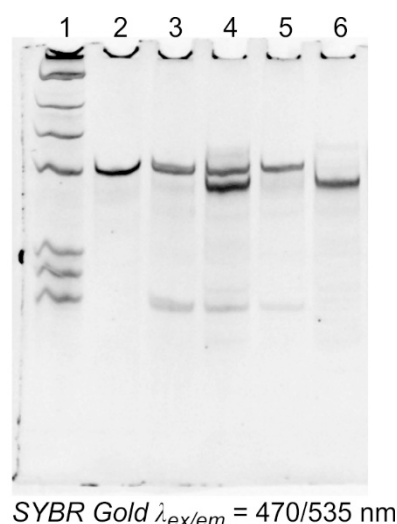


Abb. 4.1.8: Verwendete Bausteine zur Modifizierung von RNA am 5'-Terminus über *in-vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase. Prg-pG: O-(5'-Guanosin)-O-propargylmono-phosphat. N₃-G: 5'-Azido-5'-Deoxyguanosin, Azido-G.

Für die T7-Transkription wurden verschiedene Testsysteme gewählt, um die optimalen Bedingungen der Reaktion unter Verwendung des Starter-Bausteins Azido-G zu ermitteln. Dafür wurde zum einen die T7-Transkription nach der *run-off*-Methode und nach der für Prg-pG bewährten *fed-batch*-Methode durchgeführt. Als Standardansatz bei der *run-off*-Methode wurden neben 1 Äq. Azido-G einmalig 0,1 Äq. rGTP-Nukleotide zum Transkriptionsstart zugegeben (Spur 5, Abb. 4.1.9, links). Der Überschuss an Azido-G sollte den Einbau dieses als Starter-Nukleotid gegenüber rGTP begünstigen. Zum Vergleich der Reaktionsbedingungen wurden weitere Ansätze getestet: ohne Azido-G (Spur 3), mit 1 Äq. rGTPs (Spur 4), ohne DTT (Spur 6) und mit weniger DNA-Templat (Spur 7+8, alle in Abb. 4.1.9, links). Die Möglichkeit der Transkription ohne Verwendung von DTT im Transkriptionspuffer wurde untersucht, da ein reduzierender Effekt auf die Azido-Gruppe nicht ausgeschlossen werden konnte. Alle Ansätze wurden nach der Transkription mit DNase I behandelt und mit PCI-Extraktion und EtOH-Fällung aufgearbeitet und mit PAGE untersucht. Für Testzwecke wurde das verkürzte CRKL-Transkript (CRKL_{short}, CRKL_{sh}) verwendet, welches eine zum vollen CRKL-Transkript analoge Sequenz an den Termini besitzt (Abb. 4.1.2). Die Gel-Analyse zeigte eine deutlich geringere Transkription im Standardansatz im Vergleich zum Reaktionsansatz ohne Verwendung von Azido-G, jedoch mit ebenfalls nur 0,1 Äq. rGTPs (Spur 5 und Spur 3, Abb. 4.1.9, links). Alle Ansätze mit Azido-G zeigten eine zusätzliche, stärkere Bande bei der Laufweite des DNA-Templates. Die Intensität entspricht der Menge der für die Transkription eingesetzten DNA (anteilig berechnet für das aufgetragene Volumen) von etwas weniger als 1 pmol. Dies steht in Übereinstimmung mit dem aufgetragenen DNA-Templat in einer Menge von 1 pmol (Spur 2, Abb. 4.1.9, links), woraus zu schließen ist, dass der DNase-Verdau ineffektiv war. Für alle Reaktionsansätze mit Azido-G nach der *run-off*-Methode wurde im Vergleich zur analogen Reaktion ohne Azido-G eine deutlich geringere Menge an Transkriptionsprodukt beobachtet, wie beispielsweise die untere, dünne Bande in Spur 5 (Abb. 4.1.9, links) erkennen ließ. Entsprechend zeigte sich die Verwendung einer geringeren Menge an DNA-Templat (ca. 0,8 µM) als ausreichend, mit der eine ungefähr gleiche Menge RNA-Transkript gebildet wurde (Spur 8, Abb. 4.1.9, links).



Denat. PAGE, 20 %
 1 ss/miRNA-Leiter
 2 DNA-Templat CRKLsh
 3 T7 *ohne* Azido-G + 0,1 Äq. rGTP + DTT
 4 T7 mit Azido-G + 1 Äq. rGTP + DTT
 5 T7 mit Azido-G + 0,1 Äq. rGTP + DTT
 6 T7 mit Azido-G + 0,1 Äq. rGTP - DTT
 7 T7, wenig Temp. *ohne* Azido-G + DTT
 8 T7, wenig Temp. mit Azido-G + DTT



Denat. PAGE, 20 %
 1 ss/miRNA-Leiter
 2 DNA-Templat CRKLsh
 3 T7 mit Azido-G, ihT7-RNAPol /vor DNase
 4 T7 mit Azido-G, T7-Kit /vor DNase
 5 T7 mit Azido-G, ihT7-RNAPol /nach DNase
 6 T7 mit Azido-G, T7-Kit /nach DNase

Abb. 4.1.9: Verschiedene T7-Transkriptionsansätze zur Transkription von CRKLsh mit 5'-modifiziertem Starterbaustein Azido-G. Denaturierende PA-Gele (20 %) mit verschiedenen Transkriptionsansätzen mit und ohne Azido-G. links: Gel mit Transkriptionsansätzen nach der *run-off*-Methode. rechts: Gel mit Transkriptionsansätzen nach der *fed-batch*-Methode. Gele nach Färbung mit SYBR Gold. T7: T7-Transkription. Temp.: Templat.

Die generell niedrige Menge an gebildetem RNA-Transkript, von dem zu erwarten ist, dass nicht ausschließlich Azido-G als Starter eingebaut wurde, veranlasste zu weiteren Experimenten mit der *fed-batch*-Methode. Es wurde untersucht, ob die kontinuierliche Zugabe von rGTPs über die Inkubationszeit von 2 h zu einer erhöhten Transkriptionsmenge beitragen kann. Hinzukommend wurde die Transkription sowohl mit der im Arbeitskreis Arenz hergestellten T7-RNA-Polymerase (*in-house*, ihT7-RNAPol) als auch mit einem kommerziell erworbenen Transkriptionskit (T7-Kit, *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit*) getestet, mit dem bei Routinetranskriptionen ohne modifizierte Starterbausteine bereits hohe Ausbeuten erzielt werden konnten. Die Ansätze wurden nach der Transkription mit DNase I behandelt und anschließend über PCI-Extraktion und EtOH-Fällung aufgearbeitet. Die Gel-Analyse ergab, dass mit der *fed-batch*-Methode unter Verwendung des Transkriptionskits deutlich mehr RNA transkribiert wurde als mit der ihT7-RNAPol inkl. des zugehörigen Transkriptionspuffers (Spur 3 bzw. 4, Abb. 4.1.9, rechts). Im Vergleich zu den Ergebnissen mit der *run-off*-Methode, für die ausschließlich ihT7-RNAPol verwendet wurde, war die Transkriptionsbande mit dem gleichen Enzym für die *fed-batch*-Methode schwächer und weniger scharf abgegrenzt zu erkennen. Bei genauer Betrachtung der beiden Transkriptionsansätze konnten auch mehrere schwache Banden unterhalb des gewünschten Transkriptionsproduktes erkannt werden

(Spur 3-6, Abb. 4.1.9, rechts). Dies deutete auf ein stärkeres Auftreten von Transkriptionsabbrüchen während der Transkription hin, die sowohl unter Verwendung von *ihT7*-RNAPol als auch des T7-Kits auftraten. Des Weiteren zeigte der Vergleich der beiden Ansätze vor und nach dem DNase-Verdau, dass dieser für den Transkriptionsansatz mit T7-Kit deutlich effektiver funktionierte als für *ihT7*-RNAPol, obwohl dieselbe DNase I aus einem Eppi verwendet wurde. Dies deutete darauf hin, dass der im T7-Kit verwendete Transkriptionspuffer sowohl für die T7-RNA-Polymerase als auch die DNase I eine Effizienzsteigerung hervorrufen konnte.

Zur Untersuchung, ob ein Einbau von Azido-G während der Transkription stattgefunden hat, erfolgte eine Test-Clickreaktion mit den verschiedenen Ansätzen der *run-off*- und der *fed-batch*-Methode. Dafür wurden die durch PCI-Extraktion und EtOH-Fällung aufgearbeiteten Transkriptionsansätze in CuAAC-Ansätzen mit Cy3-Alkin inkubiert. Die anschließende Gel-Analyse zeigte für jeden Ansatz eine Cy3-anregbare Bande und somit, dass zumindest ein anteiliger Einbau von Azido-G vorgenommen wurde. Es wurde versucht möglichst gleiche Mengen an gewünschtem RNA-Transkript für jeden Ansatz aufzutragen, um einen besseren Vergleich der Cy3-Intensität zu ermöglichen. Da die Intensität der dem Mononukleotid-Cy3-Clickproduktes entsprechenden Banden im unteren Teil des Gels der Auswertung durch ihre hohe Intensität hinderlich war, wurde dieser Bereich des Gels vor der Analyse abgetrennt (vgl. Gele in Abb. 4.1.10). Für die *run-off*-Transkripte (Spur 7-10, Abb. 4.1.10, Pfeil) konnte eine Cy3-Fluoreszenzbande in unterschiedlicher Intensität beobachtet werden. Für den *run-off*-Ansatz mit weniger DNA-Templat (Spur 10, Abb. 4.1.10) wurde etwas weniger RNA aufgetragen, die jedoch ebenfalls eine Cy3-Bande in entsprechend geringer Intensität aufwies. Ebenso wurde ersichtlich, dass für 0,1 Äq. rGTP sowohl mit als auch ohne DTT-Zusatz eine ähnliche Intensität der Cy3-Bande des Transkriptes zu beobachten war (Spur 8+9, Abb. 4.1.10). Eine vollständige Reduktion der Azido-Gruppe durch DTT konnte somit nicht festgestellt werden.^[193] Bei den *fed-batch*-Ansätzen war zu erkennen, dass unter Verwendung von *ihT7*-RNAPol deutlich mehr Cy3-gelabelte Abbruchfragmente vorlagen und kaum eigentliches Transkript als bei der Verwendung des T7-Kits (Spur 3/4 bzw. 5/6, Abb. 4.1.10). Die Verhältnisse der RNA-Bande nach *SYBR-Gold*-Färbung und der Cy3-Bande bei der Laufweite des Transkriptes waren für die *fed-batch*-Methode mit T7-Kit ähnlich der entsprechenden Banden für die *run-off*-Methode mit *ihT7*-RNAPol im Standardansatz (Spur 5 bzw. 8, Abb. 4.1.10).

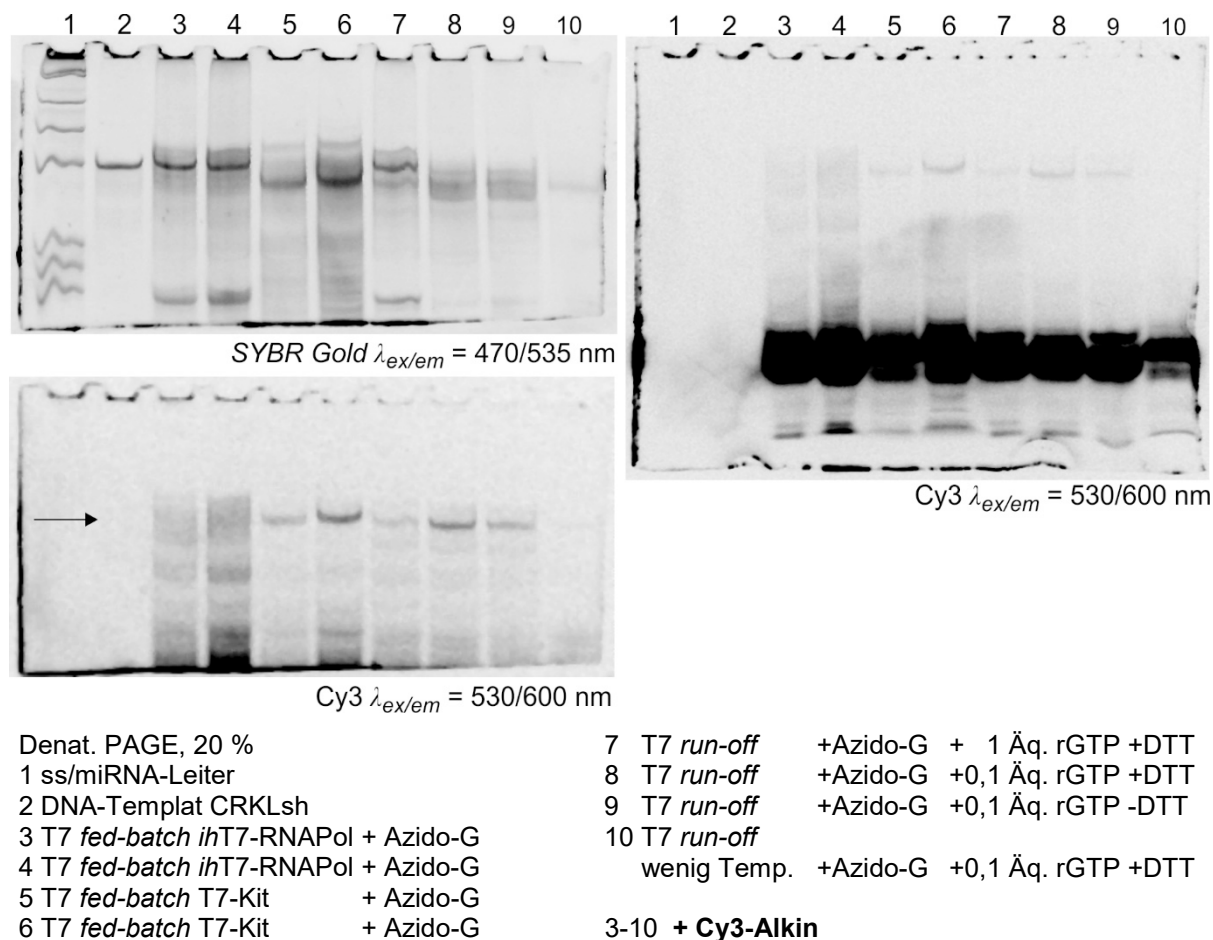


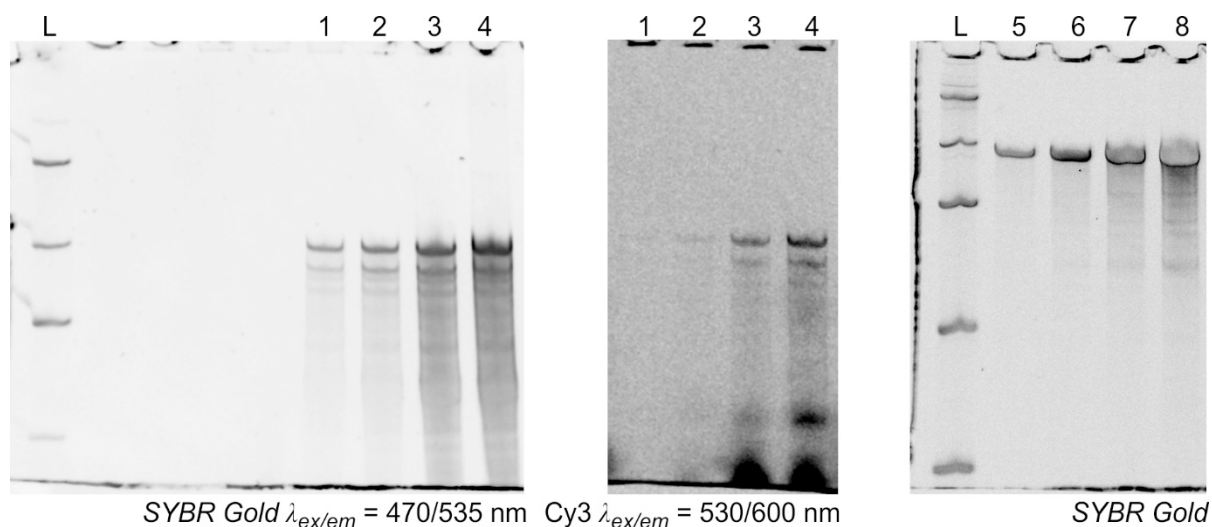
Abb. 4.1.10: T7-Transkription CRKLsh mit Azido-G und anschließende CuAAC mit Cy3-Alkin. Denaturierendes PA-Gel (20 %) mit verschiedenen Transkriptionsansätzen mit Azido-G. oben-links: Gel nach Färbung mit *SYBR Gold*. rechts und unten-links: Gel vor Färbung mit *SYBR Gold* unter Cy3-Anregung. T7: T7-Transkription. Temp.: Templat.

Zur Einschätzung der absoluten Menge maximal entstandenen Transkriptionsproduktes wurde für den Standardansatz der *run-off*-Methode mit 0,1 Äq. rGTPs eine HPLC-Reinigung durchgeführt. Die PAGE-Analyse und die Konzentrationsbestimmung der relevanten Fraktionen ergaben, dass die CRKLsh-N₃ enthaltende Fraktion auch DNA-Templat enthielt. Mit einem nach PAGE-Auftragung geschätzten Anteil von weniger als 10 % RNA-Transkript in der relevanten Fraktion konnten ca. 35 pmol RNA in einem Transkriptionsansatz von 100 µl generiert werden (Anhang, Abb. 8.1). Wie die Gel-Analyse der Transkriptionsansätze mit und ohne Verwendung von Azido-G mit der *run-off*-Methode bereits zeigte, wurde allein durch Abwesenheit von Azido-G und unter Verwendung von nur 0,1 Äq. rGTPs eine größere Menge an RNA transkribiert. Dies konnte anhand der stärkeren Bande bei der Laufweite des Transkriptionsproduktes für den Transkriptionsansatz ohne Azido-G gegenüber dem mit Azido-G beobachtet werden (Abb. 4.1.9, links, Spur 3 und Spur 5). Damit könnte die Zugabe von Azido-G die Aktivität der T7-Polymerase gehemmt haben, sodass weniger Transkript gebildet wurde, obwohl trotz der verringerten Menge an rGTPs potentiell eine höhere Transkriptionsrate möglich war. Damit ließe sich ebenso eine unzureichende DNase-Aktivität erklären, da nach DNase-Zugabe in den Ansätzen mit Azido-G kaum ein DNA-Verdau stattgefunden hat (Abb. 4.1.9, links). Dahingegen fand

ein DNase-Verdau in den Transkriptionsansätzen ohne Azido-G statt (Abb. 4.1.9, Spur 3 und 7). Dieser ineffiziente DNA-Verdau konnte auch unter Verwendung der *fed-batch*-Methode mit *ihT7*-RNAPol festgestellt werden (Abb. 4.1.9, rechts, Spur 5). Lediglich unter Verwendung des T7-Kits wurde sowohl eine höhere Menge Transkriptionsprodukt gebildet als auch ein DNA-Verdau festgestellt (Abb. 4.1.9, rechts, Spur 6). Wie jedoch anhand der Analyse der mit Cy3-gelabelten Transkripte gezeigt wurde, konnte für beide Methoden eine ähnliche Menge an Azido-G-modifiziertem Transkript in Abhängigkeit des verwendeten Enzym-Puffer-Gemisches festgestellt werden (Abb. 4.1.10). Für die *fed-batch*-Methode wurde die Verwendung des T7-Kits gegenüber *ihT7*-RNAPol bevorzugt, da letztere eine große Menge an Abbruchtranskripten erzeugte (Abb. 4.1.10, Spur 3 und 4). Damit wurden zwei T7-Transkriptionsmethoden zur Inkorporierung von Azido-G als Transkriptionsstarter mit unterschiedlichen Enzymquellen etabliert: die *run-off*-Methode unter Verwendung der *ihT7*-RNAPol bei reduzierter Menge an nichtmodifizierten rGTPs und die *fed-batch*-Methode unter Verwendung eines T7-Transkriptions-Kits mit kontinuierlicher Zugabe von nichtmodifizierten rGTPs über den Transkriptionszeitraum.

Für eine initiale Untersuchung, ob der Einbau von Azido-G in das ca. 450 nt lange CRKL-Transkript möglich war, wurde das entsprechende DNA-Templat in eine Transkription nach der *run-off*-Methode eingesetzt. Nach dem Verdau mit DNase I und der Aufarbeitung durch PCI-Extraktion und EtOH-Fällung, wurden die Transkriptionsansätze einer Click-Reaktion zugeführt. Die CuAAC mit Cy3-Alkin wurde im Anschluss in unterschiedlichen Mengen auf ein denaturierendes PAGE aufgetragen. Die Gel-Analyse zeigte bei Anregung für den Cy3-Fluorophor eine Bande bei der Laufweite des Transkriptionsproduktes (Abb. 4.1.11, Spur 5, Cy3). Dabei wurde eine geringe Intensität der Cy3-Banden im Verhältnis zur aufgetragenen RNA-Menge, die durch Anregung nach *SYBR-Gold*-Färbung sichtbar gemacht wurde, beobachtet. Dies liegt jedoch auch darin begründet, dass ein 450 nt langes RNA-Molekül nach *SYBR-Gold*-Färbung eine höhere Fluoreszenzintensität durch den interkalierenden Farbstoff besitzt als ein kurzes RNA-Molekül. Damit können aufgrund der Länge mehr *SYBR-Gold*-Moleküle pro RNA interkalieren, die in Relation zu je einem Cy3-Molekül pro RNA stehen. Neben dem CRKL-RNA-Produkt, welches mit Cy3 über ein zuvor eingebautes Azido-G gelabelt werden konnte, wurde ebenfalls eine zweite Bande beobachtet, die ebenfalls mit Cy3 gelabelt wurde. Dabei handelte es sich um ein Abbruchsegment, welches bei der Transkription entstand. Da der Einbau von Azido-G mit dem Start der Transkription vonstattengeht, ist es wahrscheinlich, dass auch Transkriptions-Abbruchfragmente anteilig diese Startsequenz besitzen. Außerdem konnten weitere, schwächere Banden unterhalb der zwei stärksten beobachtet werden, was auf weitere Abbruchfragmente hinwies. Da eine Standard-Transkription ohne Azido-G mit dem gleichen DNA-Templat keine ähnlich starken Abbruchfragmente zeigte (Abb. 4.1.11, rechts), war davon auszugehen, dass die Verwendung von Azido-G als modifizierter Transkriptionsstarter die Wahrscheinlichkeit für Transkriptionsabbrüche erhöhte. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte ein häufigeres Auftreten an Transkriptionsabbrüchen auf eine verminderte Aktivität der Polymerase zurückgeführt werden. Mögliche Gründe können die

Zugabe von Azido-G, die Zugabe der geringen Menge an rGTPs von 0,1 Äq. oder eine zu lange Inkubationszeit der Transkription sein.



Denat. PAGE, 5 %

L ssRNA-Leiter

1-4 Cy3 an CRKL, *run-off* *ih*T7-RNAPol

5-6 T7-Transkription CRKL ohne Azido-G, Standard-T7-Ansatz

Abb. 4.1.11: T7-Transkription von CRKL mit Azido-G und anschließende CuAAC mit Cy3-Alkin. Denaturierende PA-Gele (5 %) mit Transkriptionsansätzen mit und ohne Azido-G. links und rechts: Gele nach Färbung mit *SYBR Gold*. mittig: Gel vor Färbung mit *SYBR Gold* unter Cy3-Anregung.

Es wurde gezeigt, dass die ca. 450 nt große, lineare CRKL-RNA über einen speziellen Start-Guanosin-Baustein durch T7-Transkription mit einer Azido-Gruppe am 5'-Terminus modifiziert werden konnte. Dieser Modifizierung wurde mit Hilfe der CuAAC durch Gel-Analyse detektiert. Neben einer Quantifizierung des Anteils Azido-modifizierter RNA im Transkriptionsprodukt ist eine weitere Optimierung der Transkription für große RNA-Transkripte notwendig, um das Auftreten von Abbruchfragmenten zu minimieren. Eine quantitative Auswertung des Azido-G-Einbaus könnte mit dem Biotin-EMSA erfolgen, bei dem die Biotin-geclicke Azido-RNA andere Laufeigenschaften im nativen PAGE aufweist als die nicht-Azido-RNA und somit eine Quantifizierung zulässt.^[194]

4.1.3 Zyklisierungsreaktion mittels CuAAC

Wie bereits beschrieben, wurde die Zyklisierung eines 450 nt großen RNA-Transkriptes durch CuAAC mit Hilfe verschiedener Modifizierungsschritte angestrebt. Dafür war eine Funktionalisierung mit einer Azido-Gruppe am 5'-Terminus und einer Alkynylgruppe am 3'-Terminus notwendig. Neben der Möglichkeit nach Einführung der funktionellen Gruppen eine templatgesteuerte Ligation, also die Click-Reaktion mit Hilfe eines über die Verbindungsstelle führenden Primers, durchzuführen, wurde die Zyklisierungsreaktion aufgrund der Proximität der beiden Termini untersucht. Grundlage dafür bildeten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Brown, die nicht-templatgesteuerte intramolekulare Selbstclickreaktionen an DNA-Templaten zeigten. Die Proximität von 3'- und 5'-Terminus konnte

beispielsweise für die Zyklisierung mit der T4-RNA-Ligase-1 genutzt werden, bei der eine Ligation der entsprechenden Termini aufgrund der offenen Haarnadelstruktur der RNA möglich war. Die nicht-templatgesteuerte Ligation wurde dabei für die RNA CRKL und das verkürzte Analogon CRKLsh untersucht (Abb. 4.1.1, Abb. 4.1.2). Die Bildung einer zyklischen RNA nach der Ligation (circLigation) wurde mit einer Gel-Analyse ausgewertet und konnte durch das Auftreten einer RNA-Bande oberhalb der Bande linearer RNA beobachtet werden, wie für CRKL und CRKLsh gezeigt wurde (Abb. 4.1.12, Spur 3, 4, links und Spur 9-11, rechts). Der Verdau mit RNase R, einer gegenüber zyklischer RNA inaktiven RNase, bestätigte die Bildung einer zyklischen Struktur (Abb. 4.1.12, Spur 5, 6, mittig). Der Vergleich mit dem Gelauftrag vor RNase-Verdau (Abb. 4.1.12, links) ließ eine Reduktion der Bande linearer CRKL und der ebenfalls linearen Verunreinigungen unterhalb der linearen CRKL-Bande nach RNase-Verdau erkennen, jedoch keine Reduzierung der Intensität der circRNA-entsprechenden Bande (Abb. 4.1.12, mittig). Da bei der Zyklisierung von CRKLsh mit enzymatischer Ligationsreaktion nur eine geringe bis moderate Menge Zyklisierungsprodukt beobachtet werden konnte, wurden verschiedene RNA-Konstrukte für die Untersuchung der Zyklisierung durch CuAAC entwickelt (Abb. 4.1.13). Diese unterschieden sich vornehmlich in der Größe der offenen Haarnadelstruktur. Die daraus folgende unterschiedliche Proximität der Termini im offenen *Loop* wurde verwendet, um zu untersuchen, ob eine Zyklisierung mittels Click-Chemie in unterschiedlichem Maße vonstattengeht. In Anlehnung an das bereits konstruierte verkürzte CRKL-Templat CRKLsh, wurden dafür drei RNA-Transkripte generiert. Diese leiten sich von der pre-miR-21 ab, deren Länge und Sekundärstruktur für diesen Zweck geeignet war und die nur noch um eine offene Haarnadelstruktur an den Termini erweitert werden musste.

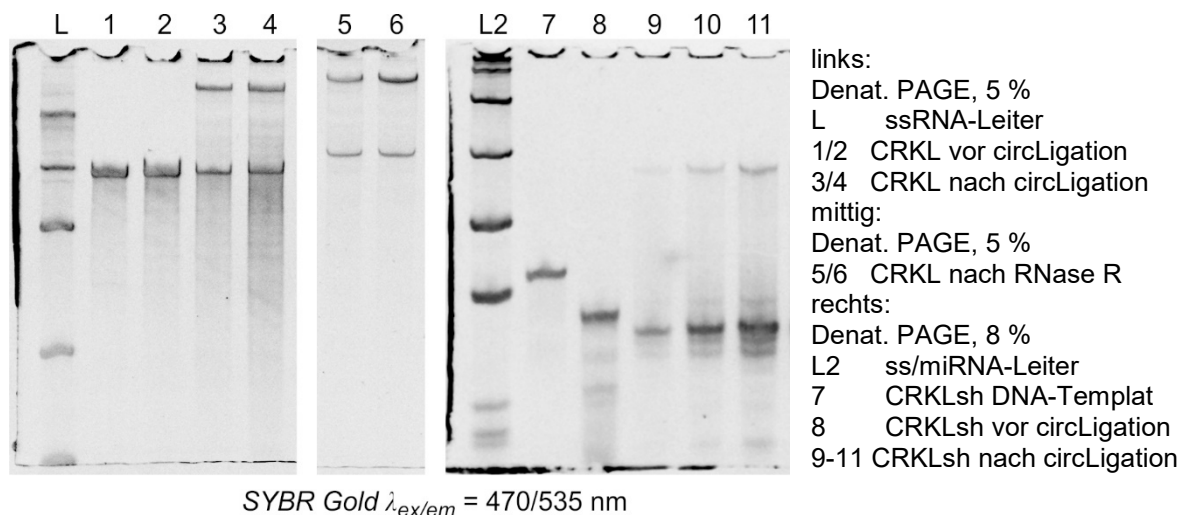


Abb. 4.1.12: Zyklisierung von CRKL und CRKLsh mit der T4-RNA-Ligase-1. Denaturierende PA-Gele (5 %, 8 %) zeigen das Substrat vor und nach der zyklischen Ligation (circLigation) und für CRKL nach RNase-R-Verdau im Anschluss and die Zyklisierungsreaktion. Gele nach Färbung mit SYBR Gold. L: 0,05-1 kb. L2: L + miRNA-Leiter.

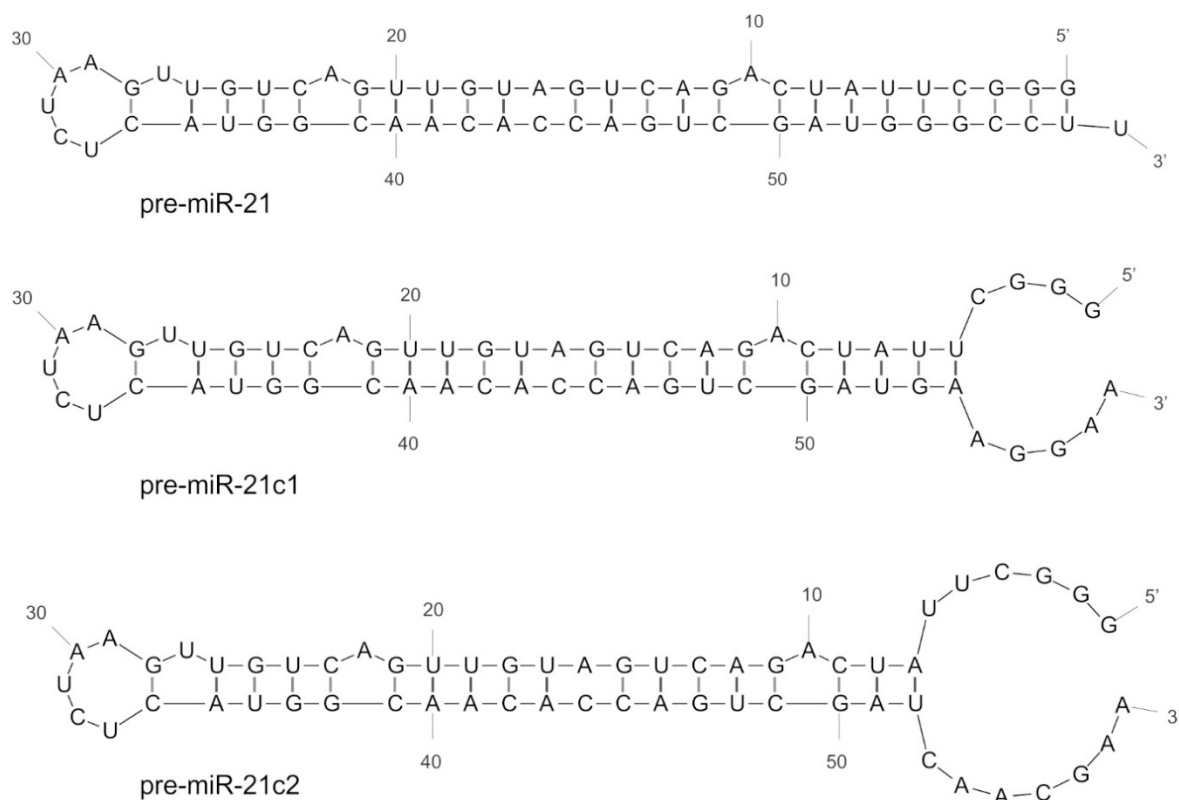


Abb. 4.1.13: RNA-Strukturen für die Zyklisierung durch Click-RNA-Ligation nach vorheriger Funktionalisierung der Termini mit Azid- und Alkin-Einheiten. Die Sekundärstrukturen wurden mit dem *RNA Folding Form* von *The mfold Web Server* erstellt.^[191]

Für die Modifizierung der drei RNA-Transkripte am 5'-Terminus wurde die *run-off*-Methode der T7-RNA-Transkription unter Verwendung der *ihT7*-RNAPol und dem Azido-G-Starter angewendet. Hinzukommend wurde, wie in Abschnitt 4.1.2 bereits untersucht, die Methode unter Verwendung einer geringen Konzentration an DNA-Templat durchgeführt. Wie in Spur 10 der Abb. 4.1.10 ersichtlich, konnte trotz des geringen Gel-Auftrages von RNA eine schwache Bande der Cy3-gelabelten und somit Azido-modifizierten RNA erkannt werden. Dies wies auf ein potentiell hohes Verhältnis von Azido-modifizierter zu nichtmodifizierter RNA hin. Zum Vergleich der Transkription wurde selbige ebenfalls in Abwesenheit von Azido-G durchgeführt. Nach der Transkription erfolgte die Aufarbeitung mit PCI-Extraktion und EtOH-Fällung, jedoch wurde kein DNase-Verdau durchgeführt, da sich dieser als ineffizient erwies (vgl. DNA-Templat in Abb. 4.1.9, links, Spur 2 mit Transkripten in Spur 3-8). Die Analyse erfolgte über die Auftragung der Ansätze auf ein denaturierendes PAGE (Abb. 4.1.14, links). Für alle Ansätze wurde eine im Verhältnis zum eingesetzten DNA-Templat große Menge RNA transkribiert. Da kein DNase-Verdau vorgenommen wurde, konnte die DNA-Bande zum Teil als schwache Bande oberhalb der Transkript-Bande identifiziert werden. Zur Untersuchung des Azido-Einbaus wurde eine Test-Clickreaktion mit Cy3-Alkin für alle drei Azido-G-enthaltenden Transkripte durchgeführt. Im Anschluss an die CuAAC wurde die jeweils gleiche RNA-Menge auf ein denaturierendes PAGE aufgetragen. Da die Auftragung direkt, also ohne Reinigungsschritt erfolgte, wurde für eine bessere Visualisierung der untere Teil des Gels, der nichtinkorporiertes Clickprodukt

entsprechend der eingesetzten Menge in hoher Intensität enthielt, vor der Analyse abgetrennt. Die Gel-Analyse zeigte in allen drei Fällen bei der Cy3-Anregungswellenlänge eine deutliche Bande bei der Laufweite der Transkripte (Abb. 4.1.14, rechts). Der visuelle Vergleich der Verhältnisse der Bandenintensität des Cy3-Labels zur *SYBR-Gold*-angeregten RNA-Bande ergab, dass für alle drei Transkripte eine ähnliche Menge an RNA mit Azido-G gelabelt werden konnte. In geringerer Intensität wurden zudem Abbruchfragmente der Transkription beobachtet, die ebenfalls mit Cy3 gelabelt waren. Die Intensität der Banden dieser Fragmente war jedoch deutlich geringer als die der gewünschten Transkript-Bande. Das Auftreten dieser Transkriptionsabbrüche könnte möglicherweise durch eine Reduktion der Inkubationszeit minimiert werden.

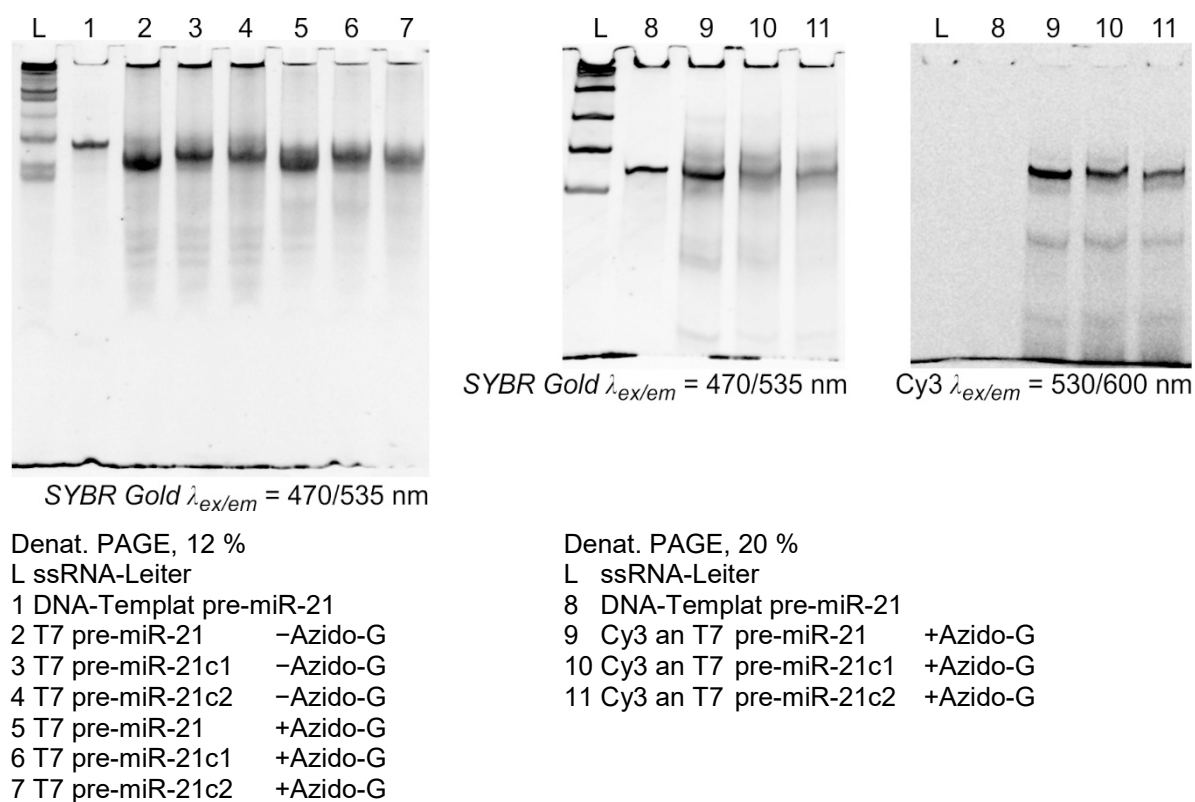


Abb. 4.1.14: T7-Transkription (T7) mit Azido-G und anschließende CuAAC mit Cy3-Alkin. Denaturierende PA-Gele (12 %, 20 %) mit verschiedenen Transkriptionsansätzen mit und ohne Azido-G. links und mittig: Gele nach Färbung mit *SYBR Gold*. rechts: Gel vor Färbung mit *SYBR Gold* unter Cy3-Anregung. Anmerkung, links: ssRNA-Leiter mit zwei Doppelbanden aufgrund von Herstellerproblemen bei der hier verwendeten Charge.

Für die Modifizierung der drei RNA-Transkripte am 3'-Terminus wurde die Ligation des Alkin-modifizierten Bausteins pU_{PrG} mit Hilfe der T4-RNA-Ligase-1 durchgeführt. Es wurden die RNA-Transkripte von pre-miR-21, pre-miR-21c1 und pre-miR-21c2 verwendet, davon jeweils die Transkriptionsprodukte unter Einbau von Azido-G. Für pre-miR-21 wurde zusätzlich das Transkript ohne Azido-G für die Ligation von pU_{PrG} verwendet. Vor der Ligation wurden alle Ansätze mit Amicon 10K-Zentrifugenfilter gereinigt, um kleinere RNA-Fragmente und Transkriptionsprimer abzutrennen. Nach der Ligation wurden die Ansätze über PCI-Extraktion und EtOH-Fällung aufgearbeitet und mit Amicon 10K-Zentrifugenfiltern gereinigt. Darauf folgend wurde untersucht, ob eine Zyklisierung der

RNA durch CuAAC zwischen den Azid- und Alkin-modifizierten Termini erreicht werden konnte. Zu diesem Zweck wurde für die drei RNA-Template zunächst ein De- und Renaturierungsschritt durchgeführt, bevor die weiteren Komponenten der Click-Reaktion hinzugeführt wurden. Ein weiterer CuAAC-Ansatz wurde zur Kontrolle der Click-Reaktion durchgeführt, der mit pre-miR-21 ohne Azido-G nach der Ligation mit pU_{Prg} und mit Cy3-Azid versetzt wurde. Der Kontrollansatz wurde nach der Reaktion mit Amicon 10K-Zentrifugenfiltern gereinigt, bevor er auf ein denaturierendes PAGE aufgetragen wurde. Alle anderen Ansätze wurden direkt nach der Reaktion aufgetragen, um zu verhindern, dass Clickprodukte durch eine Aufarbeitung verloren gehen. Die Gel-Analyse zeigte ein Signal der Cy3-gelabelten RNA-Bande nach Cy3-Anregung, wodurch die Integrität der CuAAC gezeigt wurde (Abb. 4.1.15, Spur 3). Die Ansätze der drei Zyklisierungsreaktionen wurden ebenfalls mit PAGE ausgewertet und zeigen ein nichteindeutiges Ergebnis: Oberhalb der Bande der linearen RNA konnte zwar eine zweite, zusätzliche Bande beobachtet werden, jedoch wurde dieselbe ebenfalls bei einer Kontrollauftragung von pre-miR-21 RNA nach der Ligation, aber vor der CuAAC beobachtet (Abb. 4.1.15, Spur 4). Auch die Gel-Auftragung der Cy3-gelabelten Kontrollreaktion lässt eine schwache Bande bei gleicher Laufweite erkennen (Abb. 4.1.15, Spur 3). Dies ließ die Vermutung zu, dass es sich um ein undefiniertes Artefakt handelte, jedoch nicht um ein tatsächliches Zyklisierungsprodukt.

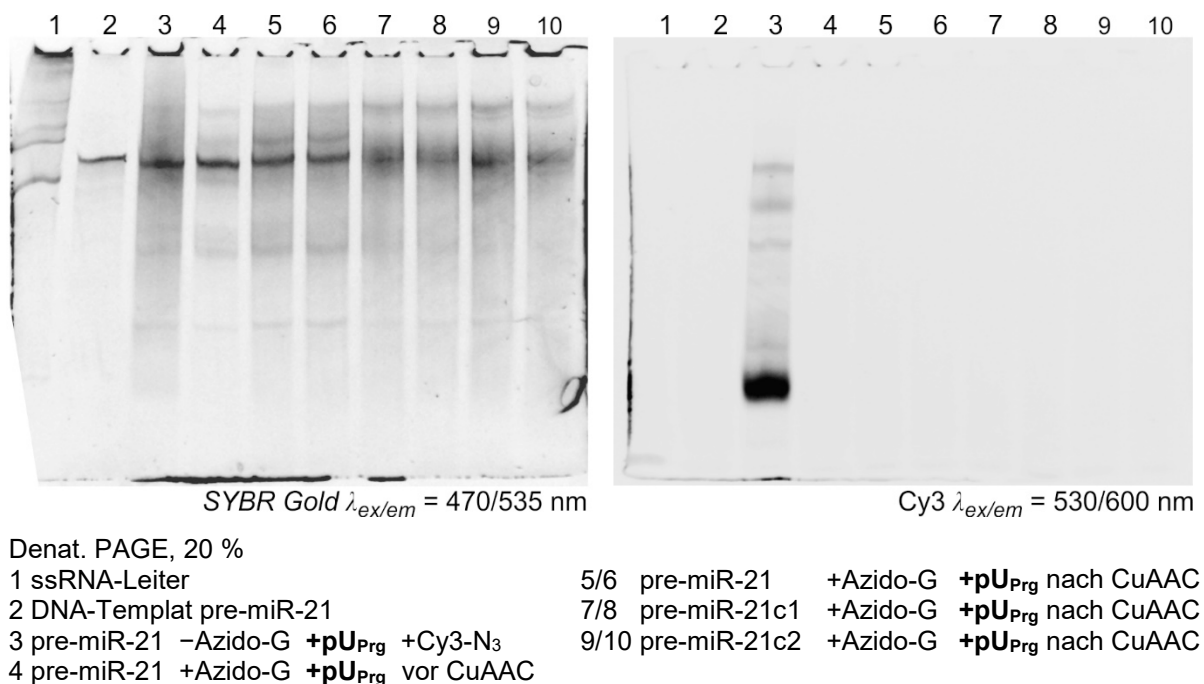


Abb. 4.1.15: Ligation pU_{Prg} und Zyklisierungsreaktion mit Click-RNA-Ligation. Denaturierendes PA-Gel (20 %) mit verschiedenen Click-Ansätzen. Spur 3 zeigt Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid an pU_{Prg}. links: Gel nach Färbung mit SYBR Gold. rechts: Gel vor Färbung mit SYBR Gold unter Cy3-Anregung.

Zur Untersuchung des Ursprungs der nach Ligation und CuAAC aufgetretenen zusätzlichen Bande wurden die Transkriptionsansätze der drei RNA-Template mit und ohne Azido-G-Starter erneut auf ein PAGE in etwas größerer Menge aufgetragen (Abb. 4.1.16). Es konnte beobachtet werden, dass die zusätzliche Bande oberhalb der eigentlichen, dem Transkriptionsprodukt entsprechenden Bande

ebenfalls auftrat (Abb. 4.1.16, Spur 6-8). Damit wurde gezeigt, dass es sich nicht um ein Clickprodukt handelte, sondern um ein Artefakt aus der Transkriptionsreaktion. Der Vergleich zwischen den Transkriptionen mit und ohne Azido-G-Starter ergab, dass für die Reaktion mit Azido-G die zusätzliche Bande oberhalb der Transkriptionsbande stärker hervortrat, als bei den Ansätzen ohne Azido-G. Für die Ansätze ohne Azido-G wurden jedoch ebenfalls zusätzliche Banden beobachtet, die sich bei gleicher Laufweite befanden wie bei den Ansätzen mit Azido-G oder etwas unterhalb dieser, bei der Laufweite des DNA-Templates. Es wurde vermutet, dass es sich in beiden Fällen um DNA-Templat handelte, welches trotz Verwendung denaturierender PA-Gele mit einem RNA-Transkript möglicherweise ein Dimer bildete, das andere Laufeigenschaften besaß. Die unterschiedlichen Laufweiten der zusätzlichen Banden könnten durch die Formierung unterschiedlicher Dimere oder Multimere erklärt werden. Die Bildung eines solchen, vermutlichen DNA/RNA-Duplex konnte auch für einige andere Transkriptionen beobachtet werden, wobei eine Abhängigkeit zum verwendeten DNA-Templat bzw. dessen Sequenz bestand. Die zusätzliche Bande konnte dabei nicht durch DNase-Verdau entfernt werden und auch die HPLC-Reinigung führte zu keiner zufriedenstellenden Abtrennung oder zu hohen Verlusten.

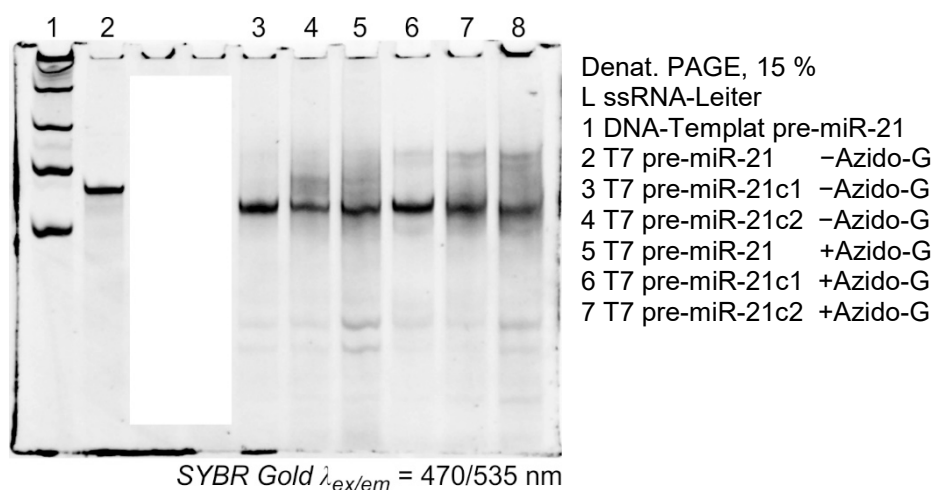


Abb. 4.1.16: T7-Transkription (T7) von drei RNA-Transkripten mit und ohne Azido-G. Denaturierendes PA-Gel (15 %) nach Färbung mit SYBR Gold.

Da diese zusätzlichen Banden ungefähr bei der Laufweite des zu erwartenden Zyklisierungsproduktes lagen, konnte keine eindeutige Aussage in weiteren Untersuchungen getroffen werden. Zusätzliche Reinigungsschritte des Transkriptionsproduktes wären notwendig, um die Zyklisierung durch CuAAC mit der Gel-Analyse untersuchen zu können. Die Reinigung durch PAGE-Auftrag stellt eine Möglichkeit dar, unerwünschte Banden zu eliminieren, indem die gewünschte Bande aus einem präparativen Gel ausgeschnitten und die RNA über Gel-Elution extrahiert wird. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Modifizierung der Transkription. Im Arbeitskreis Arenz wurden für kurze Transkripte bis 100 nt generell einzelsträngige DNA-Templates in Kombination mit einem kurzen Primer verwendet, der eine doppelsträngige Promotorsequenz bildete, was hinreichende Transkriptionskriterien

für die T7-Polymerase darstellte. Die Verwendung doppelsträngiger DNA könnte verhindern, dass Dimere mit RNA gebildet werden und somit auch einen DNase-I-Verdau ermöglichen.

Bezugnehmend auf den Zyklisierungsversuch mit drei verschiedenen RNA-Template, wurde nun überprüft, ob für die Transkriptionsprodukte mit Azido-G eine Ligation am 3'-Terminus mit pU_{Prg} stattfand. Dabei wurden die aufgearbeiteten Ligationsansätze in einer zur Zyklisierungsreaktion analogen CuAAC eingesetzt, jedoch unter Verwendung von Cy3-Azid zum Labeln am 3'-Terminus. Die Ansätze wurden nach der Click-Reaktion über Amicon 10K-Zentrifugenfilter aufgearbeitet und auf ein denaturierendes PAGE aufgetragen. Für alle drei RNA-Template konnte eine Bande durch Cy3-Anregung identifiziert werden (Abb. 4.1.17, Spur 4-6). Im Vergleich mit den Intensitäten der entsprechenden RNA-Banden nach *SYBR-Gold*-Färbung wurde beobachtet, dass die hohe Menge aufgetragener RNA eine relativ geringe Cy3-Fluoreszenzintensität zeigte, was auf eine geringe Ligationsrate hinwies. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Anteil 3'-Alkin-gelabelter RNA für eine erfolgreiche Zyklisierungsreaktion zu gering war.

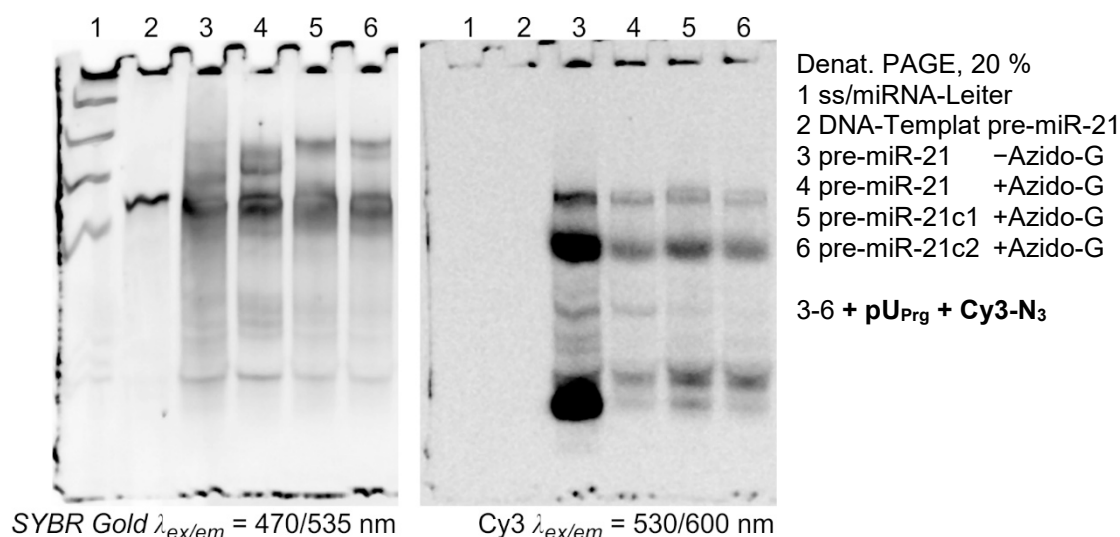


Abb. 4.1.17: Ligation pU_{Prg} und anschließende CuAAC mit Cy3-Azid. Denaturierendes PA-Gel (20 %) mit RNA nach der Ligation von pU_{Prg} und Test-Clickreaktion mit Cy3-Azid. links: Gel nach Färbung mit *SYBR Gold*. rechts: Gel vor Färbung mit *SYBR Gold* unter Cy3-Anregung.

Die Versuche zeigten erste Ansätze zur Optimierung der Methodik zur Zyklisierung mit Hilfe der CuAAC. Eine 5'-Modifizierung mit einem Azido-gelabelten Transkriptionsstarter war möglich und in Abhängigkeit von der Transkriptionsmethode wurde der Anteil Azido-tragender RNA beeinflusst. Da eine direkte Aufarbeitung zur Trennung von Azido-G-gelabelter und nicht-gelabelter RNA mit einfachen Mitteln wie HPLC-Reinigung oder Gel-Elution aufgrund der Ähnlichkeit der Moleküle nicht möglich war, wurde angestrebt, einen möglichst hohen Anteil Azido-G-gelabelter RNA zu transkribieren. Entsprechend war in der darauffolgenden Ligation von pU_{Prg} nicht eindeutig zu bestimmen, ob in der Ligationsreaktion vornehmlich nicht 5'-gelabelte RNA bevorzugt wurde, also eine Präferenz diesbezüglich bestand. Die Analyse der Ligation durch Cy3-Labeling ließ vermuten, dass

wahrscheinlich eine zu geringe Menge zweifach Azid/Alkin-modifizierter RNA entstanden war (Abb. 4.1.17).

4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion der chemo-enzymatischen Methoden zur RNA-Zyklisierung

Die durchgeführten Versuche dienten der Etablierung einer Strategie in Kombination aus enzymatischen und chemischen Verfahren zur Zyklisierung von RNA mit einer Länge von ca. 500 nt. Die Modifizierung der Termini mit einer Alkin- und einer Azid-Einheit sollte einen Ringschluss durch CuAAC ermöglichen, um die Enden der offenen Haarnadelstruktur der Sequenz im Bereich der Termini zu schließen.

Zur Analyse der jeweiligen Schritte des Einbaus von Azid- und Alkineinheiten wurden nach jedem Schritt Testreaktionen durchgeführt, um mit CuAAC ein Cy3-Fluorophor einzuführen und somit die Visualisierung der eingebauten Azid- oder Alkineinheit zu ermöglichen. Da die Untersuchungen mit Reaktionsansätzen in kleinem Maßstab durchgeführt wurden, erfolgte die Analyse visuell mittels PAGE-Auswertung. Dies ermöglichte zudem eine schnelle Auswertung mit geringem Aufwand der Probenvorbereitung und ebenso einen geringen Probenverbrauch.

Für die Modifizierung der RNA am 5'-Terminus wurde die Methode der T7-Transkription mit modifizierter Starter-Einheit gewählt, deren Einbau nur zum Transkriptionsstart möglich war, jedoch nicht zur weiteren Kettenverlängerung innerhalb der RNA-Sequenz. Zu diesem Zweck wurde ein Azido-G-Baustein synthetisiert, dessen Einbau als Transkriptionsstarter für kurze RNA-Moleküle bereits gezeigt wurde. Zur Evaluierung verschiedener Transkriptionsmethoden wurde ein verkürztes CRKL-Templat verwendet (CRKLsh), welches die gleiche Start- und Endsequenz wie das CRKL besaß. Es wurden die *fed-batch*-Methode und die *run-off*-Methode verwendet, um den Einbau von Azido-G zu optimieren. Dabei erwies sich die *fed-batch*-Methode unter Verwendung eines kommerziellen Transkriptionskits und die *run-off*-Methode unter Verwendung der im Arbeitskreis Arenz hergestellten Polymerase *ihT7*-RNAPol als geeignet. Die Transkriptionsausbeuten für Transkriptionsansätze mit Azido-G wurden besonders für die letztgenannte Methode im Vergleich zu Ansätzen ohne Verwendung von Azido-G als geringer eingestuft. Jedoch konnte mit der *run-off*-Methode besonders mit dem Einsatz geringer Mengen DNA-Templat ein häufiger Einbau des Azido-G-Starters in das Transkriptionsprodukt erreicht werden. Eine Problematik bei der Aufarbeitung der Reaktion bestand darin, dass eine Trennung von Azido-modifizierter und nichtmodifizierter RNA über einfache Trennmethode nur nach Click-Reaktion mit einer Substanz, welche die Größe und Polarität des Moleküls signifikant änderte, möglich war. Daher wurde auf eine Trennung des Transkriptionsgemisches verzichtet und die nichtmodifizierten Nebenprodukte als nichtreaktive Spezies bezüglich der Zyklisierungsreaktion toleriert.

Nach dem Einbau der Azido-Einheit am 5'-Terminus wurde für die Zyklisierungsreaktion eine Alkin-Einheit am 3'-Terminus eingebaut. Dafür wurde das 3'-propargylierte pU_{Prg} verwendet, dessen Ligation mit der T4-RNA-Ligase-1 an den 3'-Terminus von RNA möglich war. Die Arbeit von Kikuchi *et al.*^[195]

zeigte, dass nur 3',5'-Bisphosphat-Nukleoside, jedoch nicht 2',5'-Bisphosphat-Nukleoside mit der T4-Rnl1 an ein RNA-Molekül ligiert wurden, weshalb auf eine essentielle Bedeutung der 3'-Phosphat-Einheit geschlossen wurde. Barrio *et al.*^[154] kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass eine Ligation von 2',5'-Bisphosphat-Nukleosiden mit 3'-O-Methyl-Einheit an ein entsprechendes RNA-Templat nicht möglich war, im Gegensatz zu ihrem 3',5'-Bisphosphat-Äquivalent mit 2'-O-Methyl-Einheit. Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch Nukleoside mit 3'-O-Propargyleinheit und ohne 3'-Phosphatgruppe ligiert werden konnten. Dies geschah mit ähnlicher Ausbeute wie die Ligation eines 3',5'-Bisphosphat-Nukleosides, welches an der Uridineinheit mit einem Alkin modifiziert wurde (pUp^{Alk}). Untersuchungen von Hinton *et al.*^[196] ergaben, dass auch 3',5'-Bisphosphat-Nukleoside mit 2'-Desoxy-Einheit eine Ligationsreaktion mit T4-RNA-Ligase-1 eingehen konnten und zeigten so, dass die fehlende 2'-Hydroxy-Einheit, welche durch eine Phosphatgruppe ersetzt wurde, nicht der Grund für die verweigerte Ligation war. Jedoch wurde in der genannten Arbeit als Akzeptor ein DNA-Templat verwendet und eine lange Reaktionszeit von 6 Tagen in Kauf genommen. Untersuchungen von Barrio *et al.*^[154] zeigten ebenfalls die Verwendung eines 2'-Desoxy-Nukleosids mit 3',5'-Bisphosphatgruppen als Donor der Ligation durch T4-RNA-Ligase-1 an einen RNA-Akzeptor, jedoch ohne Minimierung der Ausbeute. In der vorliegenden Arbeit wurde neben pU_{Prg} ebenso eine Variante dieses Bausteins mit einer 2'-Desoxygruppe (pdU_{Prg}) zur Ligation an eine Akzeptor-RNA verwendet. Die Ligation konnte beobachtet werden, aber im Vergleich zu pU_{Prg} mit geringerem Einbauerfolg. Damit wurde gezeigt, dass die verwendete Ligase ein 2'-Desoxy-Nukleosid als Donor akzeptierte und dies unabhängig vom Vorhandensein einer 3'-Phosphatgruppe geschah. Da sowohl das 3'-Phosphat-enthaltende pUp^{Alk} als auch das 3'-Phosphat-defizitäre pU_{Prg}, die jeweils eine 2'-Hydroxygruppe besitzen, gleichermaßen als Donor in der Ligation angenommen wurden, bestand die Vermutung, dass die 3'-Phosphatgruppe nicht essentiell für einen Donor der T4-Rnl1 war. Vielmehr ließ die Untersuchung der Ligation mit dem 2'-Desoxy-Nukleosid pdU_{Prg} darauf schließen, dass die Ligation mit 2'-Hydroxy-defizitären Donoren eine geringere Ausbeute lieferte. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in Ligationsstudien von Barrio *et al.*^[154] mit einem 3',5'-Bisphosphat-2'-Desoxy-Nukleosid (pdCp) festgestellt, dass ein Fehlen der 2'-Hydroxygruppe keinen Einfluss auf die Ligationsausbeute hatte. Das deutet möglicherweise auf die Variabilität der Ligationsfähigkeit mit T4-Rnl1 in Abhängigkeit des jeweiligen, individuell modifizierten bzw. funktionalisierten Donor-Nukleotides hin.

Die Möglichkeit der Zyklisierung durch Modifizierung der Termini und anschließendem Ringschluss mittels Click-Chemie wurde bereits von der Gruppe um Brown für DNA-Oligonukleotide untersucht. Der Gruppe gelang die Zyklisierung einer ca. 70 nt langen DNA, welche während der Festphasensynthese durch modifizierte Nukleotide an den Termini mit je einem Alkin und Azid modifiziert wurde.^[197] Die so generierte DNA konnte ohne eine templatgesteuerte Methode durch intramolekulare Selbst-Clickreaktion mit CuAAC zyklisiert werden. Die Sekundärstruktur der verwendeten DNA ähnelte dabei einer offenen Haarnadelstruktur, jedoch befand sich die Öffnung der Schleife nah am doppelsträngigen Stammbereich (Abb. 4.1.18, links). In einer anderen Arbeit der

Gruppe wurde eine Alkin-/Azid-modifizierte 100-nt-DNA sowohl Templat-gesteuert als auch ohne Templat unter Verwendung der Clickchemie zyklisiert.^[192] Auffällig war auch in diesem Fall die Nähe der offenen Haarnadelschleife zu einem kurzen doppelsträngigen Strukturabschnitt (Abb. 4.1.18, rechts).

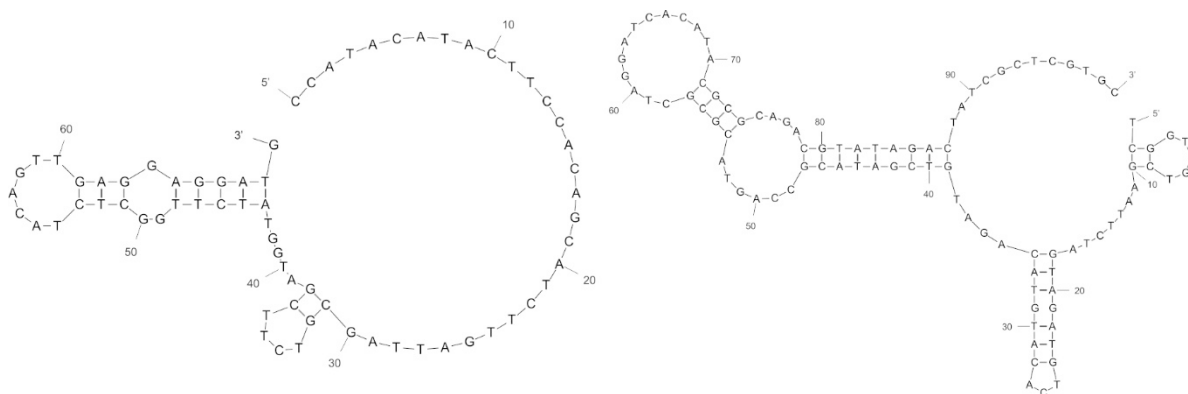


Abb. 4.1.18: DNA-Template zum Einsatz in der Zyklisierung durch Click-DNA-Ligation. Sequenzen nach Arbeiten zur nicht-templatgesteuerten Click-DNA-Ligation der Arbeitsgruppe um Brown.^[192, 197] Die Berechnung der Sekundärstruktur erfolgte mit dem *DNA Folding Form* von *The mfold Web Server*.^[191]

In der vorliegenden Arbeit wurden drei RNA-Oligonukleotide mit unterschiedlicher Haarnadelstruktur, abgeleitet von der für T7-Transkription angepassten pre-miR-21 entwickelt (Abb. 4.1.13). Mit Hilfe der bereits beschriebenen Strategien zum Einbau funktionalisierter Nukleotide während des Transkriptionsstartes am 5'-Terminus und durch enzymatische Ligation am 3'-Terminus sollte die Einführung der Click-Komponenten erfolgen. Durch Modifizierung der Termini mit je einer Alkin- und Azid-Gruppe wurde untersucht, ob eine nicht-templatgesteuerte intramolekulare Selbst-Clickreaktion durch CuAAC stattfinden konnte. Eine Auswertung der Zyklisierungsreaktion mit denaturierender PAGE war möglich, da lineare und zyklisierte RNA unterschiedliche Laufeigenschaften aufweisen, wobei die zyklisierte Form eine geringere Gel-Mobilität besitzt und entsprechend einen kürzeren Weg zurücklegt.^[197] Mit Hilfe der Gel-Analyse der Ansätze nach der Zyklisierungsreaktion konnte jedoch keine Zyklisierung beobachtet werden. Eine Schwierigkeit in der Visualisierung in der Gel-Analyse ergab sich durch das Auftreten von zusätzlichen Banden, die als Artefakte der T7-Transkription bzw. DNA/RNA-Verbindungen identifiziert wurden. Da diese zusätzlichen Banden bei der Laufweite der potentiellen Zyklisierungsbande auftraten, erschwerte dies eine eindeutige Identifizierung von Banden einer zyklisierten RNA.

Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der Zyklisierungsreaktion könnte ein zu geringer Anteil zweifach funktionalisierter RNA im Reaktionsgemisch sein. Dieses enthielt nach der Transkription Azido-G-modifizierte RNA und nicht-modifizierte RNA. In der nachfolgenden Ligation am 3'-Ende der RNA besteht für beide Transkripte die Möglichkeit der Ligation, wobei keine komplette Ligation aller RNA-Moleküle zu erwarten ist. Daraus folgt, dass entweder eine statistische Verteilung der Ligation oder eine Bevorzugung in Abhängigkeit der Azido-Gruppe stattgefunden hat. Basierend auf den gezeigten

Ergebnissen zur Zyklisierungsreaktion wurde eine zu geringe Ausbeute bei der T4-RNA-Ligation des Nukleotides an die Azido-G-RNA vermutet.

Zahlreiche Arbeiten thematisierten die Ausbeute bei der Ligation mit T4-RNA-Ligase-1. Bruce *et al.*^[155] zeigten, dass eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durch Anpassung von Reaktionstemperatur und DMSO-Konzentration die Effizienz der Ligation von pCp auf Ausbeuten von 80 % bis annähernd 100 % steigern konnte. Im Vergleich dazu lag die Ausbeute für dieselbe Reaktion ohne Verwendung von DMSO bei weniger als 40 %. Andere Arbeiten verdeutlichten, dass die Ausbeute starken Schwankungen ausgesetzt war, die sowohl in Abhängigkeit von unterschiedlichen RNA-Akzeptoren als auch von dem verwendeten Donor-Nukleotid stand.^[151, 154] Kikuchi *et al.*^[195] fanden eine Abhängigkeit der Ligationsausbeute von dem verwendeten Donor-Nukleotid. Daraus wurde postuliert, dass bei der Ligation Oligonukleotide mit Pyrimidinakzeptor nur von Pyrimidindonoren (pCp, pUp) bevorzugt werden, Purinakzeptoren jedoch Pyrimidin- und Purindonoren (pAp, pGp) annehmen. Jedoch wurde auch für Pyrimidindonoren eine unterschiedliche Ligationsausbeute von ca. 70 % für pCp und ca. 55 % für pUp bei Ligation an einen Purinakzeptor festgestellt. Die Ergebnisse der Arbeit wiesen auf eine uneinheitliche Ligationsfähigkeit je nach verwendetem Donornukleotid, auch in Abhängigkeit des Vorhandenseins unterschiedlicher Funktionalisierungen, hin. Aufbauend auf den hier gezeigten Ergebnissen zur T4-RNA-Ligation am 3'-Ende für die Zyklisierungsreaktion sind Quantifizierungsuntersuchungen anzustreben, die eine individuelle Einschätzung der Ligationsausbeute für das jeweilige Donor-Akzeptor-Paar zulassen.

Eine Möglichkeit zur Optimierung der Zyklisierung besteht in der Entfernung nicht 3'-modifizierter RNA durch Folgereaktion nach der Ligation am 3'-Terminus. Nach der Entfernung könnte der Anteil 5'-Azid-funktionalisierter RNA an 3'-ligierten Molekülen durch Clickreaktion mit einem Baustein wie Biotin quantifiziert werden. Eine geeignete Methode dafür stellt der Biotin-EMSA^[194] dar. Eine mögliche Folgereaktion zur Abtrennung nicht 3'-modifizierter RNA ist die Periodat-Oxidation, die am unmodifizierten 3'-Terminus eine Oxidation der 2',3'-OH-Gruppen bewirkt, die RNA mit modifiziertem 3'-Terminus jedoch nicht angreift.^[144, 157] Eine nachfolgende Reaktion der generierten Aldehydgruppen mit einem Biotin-Hydrazid könnte zur Abtrennung der unerwünschte RNA verwendet werden.^[157, 198]

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung der Zyklisierungsreaktion besteht in der Veränderung des offenen haarnadelförmigen Templates analog der DNA-Template in Arbeiten der Brown-Arbeitsgruppe, welche eine asymmetrische Haarnadelöffnung in Proximität zu einem doppelsträngigen Abschnitt der RNA-Sekundärstruktur verwendeten.^[192, 197]

4.2 Synthese von mono und dual gelabelten pre-miRNA-Sonden zur Lokalisierung der miRNA-Reifung *in cellulo*

Post-transkriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression finden auch im Gehirn statt.^[199] An diesen Prozessen sind miRNAs beteiligt, die in ihrer genauen Bedeutung und Funktion noch nicht vollständig erfasst wurden.^[200] Jedoch konnte bereits nachgewiesen werden, dass hunderte verschiedener miRNAs im Gehirn exprimiert werden, von denen viele hirnspezifisch vorkommen.^[201] Die Bedeutung dieser spezifischen miRNAs liegt in der Regulierung von Entwicklung, Differenzierung und Funktion des Nervensystems. Ihre abnormale Expression kann zu progressivem Neuronenverlust und zu Verhaltensdefekten führen, die phänotypisch mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.^[202] Spezifische miRNAs wie miR-134 sind an der Regulierung der synaptischen Proteinsynthese und der synaptischen Plastizität in den Dendriten beteiligt.^[135] Die dafür notwendige Lokalisierung von miR-134 in den Dendriten und Synapsen beschränkt sich Untersuchungen zufolge nicht nur auf die reife miR-134, sondern auch auf ihr Vorläufermolekül: die pre-miR-134.^[135] Diese dendritisch lokalisierte pre-miRNA könnte eine Art der „lokalen Rückversicherung“ darstellen, falls akut reife miRNA zur Regulation dendritischer Ziel-mRNA wie *Limk1* benötigt würde. Die zugrundeliegenden Mechanismen einer solchen lokalen Kontrolle der miRNA-Reifung sind weitestgehend unbekannt, jedoch wurde die Anwesenheit von Dicer in den Synaptosomen belegt.^[203] Dies könnte auf eine mögliche lokale Prozessierung hinweisen.

Zur Untersuchung der Lokalisierung der pre-miRNA pre-miR-134 und deren Reifung innerhalb von Nervenzellen, wurden zwei pre-miRNA-Sonden hergestellt. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie sollte untersucht werden, ob eine lokale Prozessierung von pre-miR-134 durch Dicer in den Dendriten erfolgt. Für die Einbringung der Sonden in Nervenzellen einer Primärzellkultur aus Hirnarealen der Ratte wurde die Methode der Transfektion mit Hilfe eines siRNA-Transfektionsreagenzes auf Basis kationischer Lipide vorgesehen. Eine einfach mit Cy3 5'-gelabelte pre-miR-134 wurde dabei zunächst genutzt, um die Optimierung der Transfektion zu visualisieren und erste Informationen über eine Anreicherung oder Lokalisierung der gelabelten pre-miR-134 zu erhalten (Abb. 4.2.1). Eine zweite, dual gelabelte Sonde enthielt neben dem Alexa633-Fluorophor am 3'-Terminus auch eine Dabcyl-Gruppe am 5'-Terminus (Dab-pre-134-Ax633, Abb. 4.2.1). Die Dabcyl-Gruppe kann unter der haarnadelförmigen Sekundärstruktur der pre-miRNA durch Proximität zum Fluorophor als dessen Quencher wirken. Bei der Reifung der pre-miRNA durch Dicerspaltung wird dieser Effekt aufgehoben und Fluoreszenz freigesetzt. Die Funktionalität der Sonde wurde vor dem Einsatz *in cellulo* in einem *in-vitro*-Assay getestet, basierend auf einer Assay-Methode, welche in dieser Arbeitsgruppe von Davies *et al.*^[93] entwickelt wurde. Hierfür erfolgte die Zugabe von Dicer zur Sonde und die Messung der Veränderung des Fluoreszenzsignals der Sonde über einen bestimmten Zeitraum.



Abb. 4.2.1: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der pre-miR-134 (*Rattus norvegicus*) mit verschiedenen Modifizierungen. oben: pre-miR-134 mit Cy3 am 5'-Terminus (Cy3-pre-134). unten: pre-miR-134 mit Dabcyl (Dab) am 5'-Terminus und Alexa633 (Ax633, ALX) am 3'-Terminus. Sequenzinformationen von *miRBase*^[204], modifiziert für *in-vitro*-Transkription. Die Sekundärstrukturen wurden ohne Modifizierungen mit dem *RNA Folding Form* von *The mfold Web Server* berechnet.^[191] ALX: Alexa633. DAB: Dabcyl.

Die Herstellung der Sonden erfolgte zunächst enzymatisch mit der T7-RNA-Transkription unter Verwendung der *fed-batch*-Methode nach Dojahn *et al.*^[150] zur Einführung eines modifizierten Starter-G-Bausteins, dem Propargyl-modifizierten GMP^{Prg}. Nach der Transkription mit anschließender PCI-Extraktion und Fällung, erfolgte die Modifizierung am 5'-Terminus über CuAAC durch Reaktion mit einem Cy3-Azid oder Dabcyl-Azid (Abb. 4.2.2). Für beide gelabelten Transkripte wurde nach der Aufarbeitung des Click-Ansatzes die Trennung von ungelabeltem Transkript mit präparativer HPLC durchgeführt. Anhand der Konzentrationsbestimmung nach HPLC-Aufarbeitung wurde ermittelt, dass mit einem 100- μ l-Transkriptionsansatz durchschnittlich 80 pmol der generierten Cy3-pre-134 hergestellt werden konnten (Anhang, Abb. 8.2). Das nach HPLC-Trennung aus den relevanten Fraktionen ermittelte Verhältnis von gelabelter zu ungelabelter pre-miR-134 betrug ca. 1:20 (Anhang, Abb. 8.2). Die Gel-Analyse zeigt die Cy3- und Ax633-modifizierten Sonden in denaturierter Form (Abb. 4.2.2).

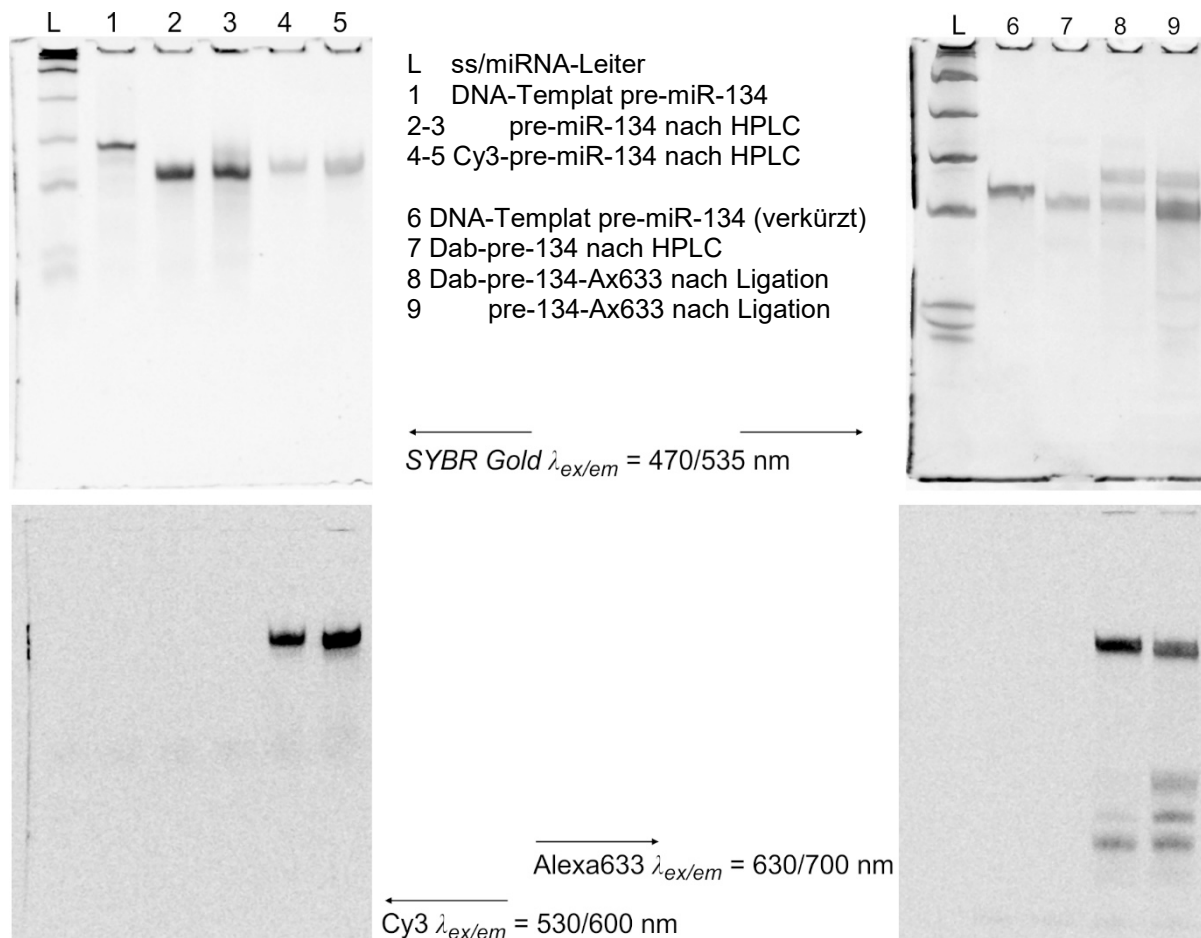


Abb. 4.2.2: Einfach gelabelte Sonde mit Cy3 am 5'-Terminus und zweifach gelabelte Sonde mit 5'-Dab- und 3'-Alexa633-Modifizierung. Denaturierende PA-Gele (links: 8 %, rechts: 20 %) zeigen Cy3-pre-134 vor und nach der Click-Reaktion mit Cy3-Azid nach HPLC-Aufarbeitung (links) und Dab-pre-134-Ax633 vor und nach Ligation mit einem 3'-Ax633-RNA-11-mer. Die oberen Gele zeigen die RNA nach der Färbung mit *SYBR Gold*, die unteren Gele zeigen die Fluorophor-gelabelte RNA bei deren jeweiliger Anregungswellenlänge vor der *SYBR Gold*-Färbung.

Für die dual gelabelte Sonde erfolgte die 3'-Modifizierung über Ligation mit Hilfe der T4-RNA-Ligase-1. Dabei wurde ein 11 nt, 5'-Phosphat-, 3'-Alexa633-modifiziertes RNA-Stück an das entsprechende RNA-Transkript ligiert (Abb. 4.2.3). Dieses 11-nt-Stück wurde in 3- bis 5-fachem Überschuss bezüglich Dab-pre-134 eingesetzt. Nach der Ligation mit nachfolgender PCI-Extraktion und Fällung, erfolgte die Trennung von ligierter und nicht-ligierter pre-miR-134 mit der präparativen HPLC (Anhang, Abb. 8.2). Die anschließende Konzentrationsbestimmung und die PAGE-Analyse, zeigten ein Verhältnis von ligierter zu nicht-ligierter RNA von ca. 1:1 (Spur 8, Abb. 4.2.2). Zu Vergleichszwecken wurde eine Testligation des kurzen RNA-Stückes an ein analoges RNA-Transkript ohne Dabcytl-Label und ohne modifiziertes Starter-G durchgeführt. Die PAGE-Analyse ergab keine erhöhte Ausbeute in der Testligation (Spur 9, Abb. 4.2.2), wodurch gezeigt wurde, dass die verwendete 5'-Modifizierung keinen inhibierenden Effekt auf die T4-Ligationsreaktion hatte. Anhand der Konzentrationsbestimmung nach HPLC-Aufarbeitung wurde ermittelt, dass mit einem 100- μ l-Transkriptionsansatz durchschnittlich 100 pmol an Dab-pre-134 hergestellt werden konnten. Für Dab-pre-134-Ax633 betrug die absolute Ausbeute

unter dem Einsatz von Transkript aus einem 100- μ l-Transkriptionsansatz nach Ligation und nachfolgender HPLC-Aufarbeitung eine Menge von ca. 20 pmol (Anhang, Abb. 8.2).

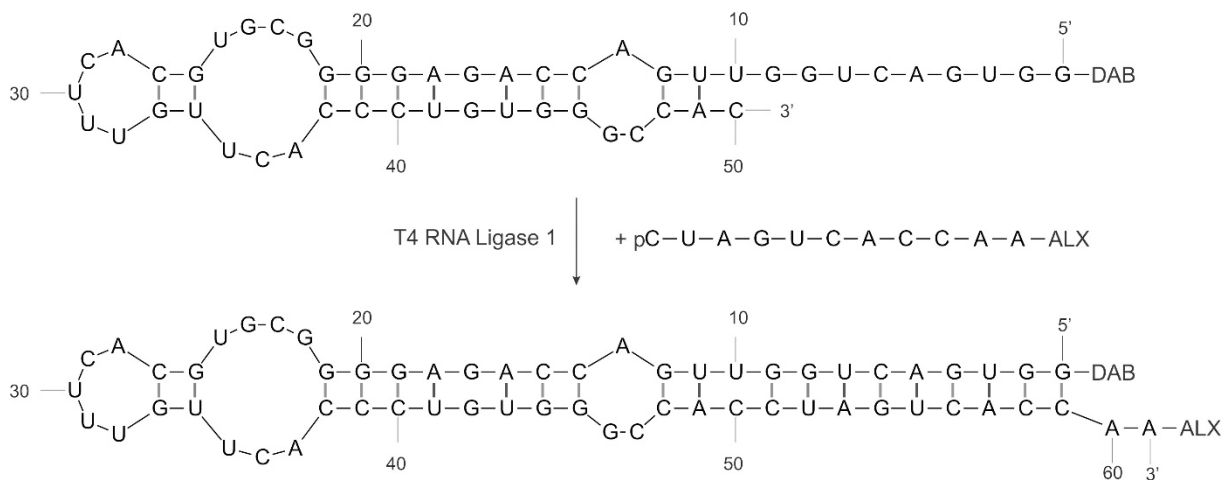


Abb. 4.2.3: Schematische Darstellung des Ligationsschrittes zur Herstellung der dual gelabelten Sonde Dab-pre-134-Ax633. Ein entsprechend kurzes, bereits am 5'-Terminus mit Dabcyl gelabeltes RNA-Transkript diente als Akzeptor eines kurzen, synthetisch hergestellten, mit Alexa633 3'-modifizierten RNA-11-mers. ALX: Alexa633. DAB: Dabcyl.

Die Sonde Dab-pre-134-Ax633 wurde zunächst *in vitro* mit dem Fluoreszenz-basierenden Dicer-vermittelten Reifungsassay untersucht. Dabei sollte die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Dicer-vermittelten Spaltung gezeigt werden. Dazu wurden 100 nM der Sonde nach einem De-/Renaturierungs-Schritt mit 20 U/ml rekombinantem, humanem Dicer (rhDicer) versetzt. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz unter Verwendung von denaturiertem Dicer gemessen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von 4 h in Abständen von 30 min. Dabei wurde für den Ansatz mit nativem rhDicer ein stetiger Anstieg beobachtet, der nach 4 h auf das 3-fache des Fluoreszenzsignals vor Dicerzugabe anstieg (Abb. 4.2.4, links). Die Messung unter Zugabe von denaturiertem Dicer ergab keinen Anstieg der Fluoreszenz über den gemessenen Zeitraum (Abb. 4.2.4, rechts), wodurch gezeigt wurde, dass der Fluoreszenzanstieg auf eine Prozessierung durch Dicer zurückgeführt werden konnte. Vorhergehende Untersuchungen von Dr. Brian Davies im Arbeitskreis Arenz zum Dicer-vermittelten Spaltungsassay *in vitro* demonstrierten, dass ein Fluoreszenzanstieg durch unspezifische RNasen ausgeschlossen werden kann, da auch unter Verwendung von Zell-Lysat als Dicer-Quelle mit einem finalen Anteil von 10 % ein gleichhoher Fluoreszenzanstieg sowohl mit als auch ohne RNase-Inhibitor-Zugabe zu beobachten war.^[63]

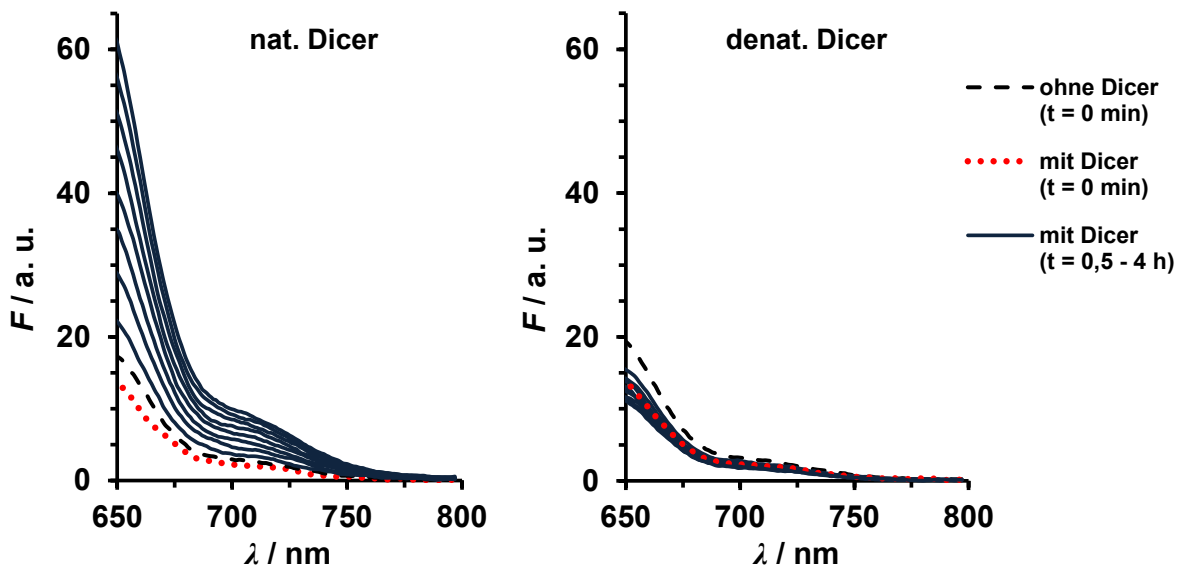


Abb. 4.2.4: Spaltung der dual gelabelten Dab-pre-134-Ax633 durch rhDicer *in vitro*. Der Dicer-vermittelte Fluoreszenzanstieg wurde über 4 h im Abstand von je 30 min bei 37 °C gemessen. Es wurde jeweils 100 nM gelabelte Sonde mit 20 U/ml nativem (nat.) rhDicer und denaturiertem (denat.) rhDicer inkubiert. Weitere Reaktionsbedingungen: 1x Dicer-Puffer.

Um die biologische Anwendung zu zeigen, wurden die mono und dual gelabelten pre-miRNA-Sonden in neuronale Primärzellkulturen der Ratte transfiziert. Die dafür notwendigen biologischen Arbeiten sowie die Mikroskopieexperimente wurden von Federico Zampa (Arbeitsgruppe von Prof. Gerhard Schratt, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

Die Transfektion der pre-miRNA-Sonden erfolgte mit dem Transfektionsreagenz siPORT NeoFx (Ambion). Dabei wurden jeweils 20 pmol der gelabelten Sonde mit einer finalen Konzentration von 60 nM transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit MAP2 (grün) gefärbt, um die Dendriten zu visualisieren. Zudem wurden die Nuclei mit Hoechst (blau) gefärbt. Die Transfektion, Fixierung und Färbung erfolgte analog zu den von Bicker *et al.*^[135] beschriebenen Methoden. Die so präparierten Zellen wurden mit konfokaler Mikroskopie visualisiert.

Zur Untersuchung der Transfektionsbedingungen und zur Evaluierung der Transfizierbarkeit der Sonde, wurde zunächst die 5'-Cy3-gelabelte Cy3-pre-134 getestet. Die mit konfokaler Mikroskopie aufgenommenen Bilder zeigen eine Anreicherung des Cy3-Signals (rot) im Bereich der Neuronen, und weisen auf eine erfolgreiche Transfektion von Cy3-pre-134 hin (Abb. 4.2.5). Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale von Cy3 und MAP2-Färbung zeigte ebenfalls eine Lokalisierung der Signale im selben Bereich. Das Vorkommen von Fluoreszenzsignal sowohl im Zellkörper (um den Zellkern herum) wie auch in den Dendriten zeigte eine gleichmäßige Verteilung innerhalb einer Nervenzelle (Abb. 4.2.5, Pfeile).

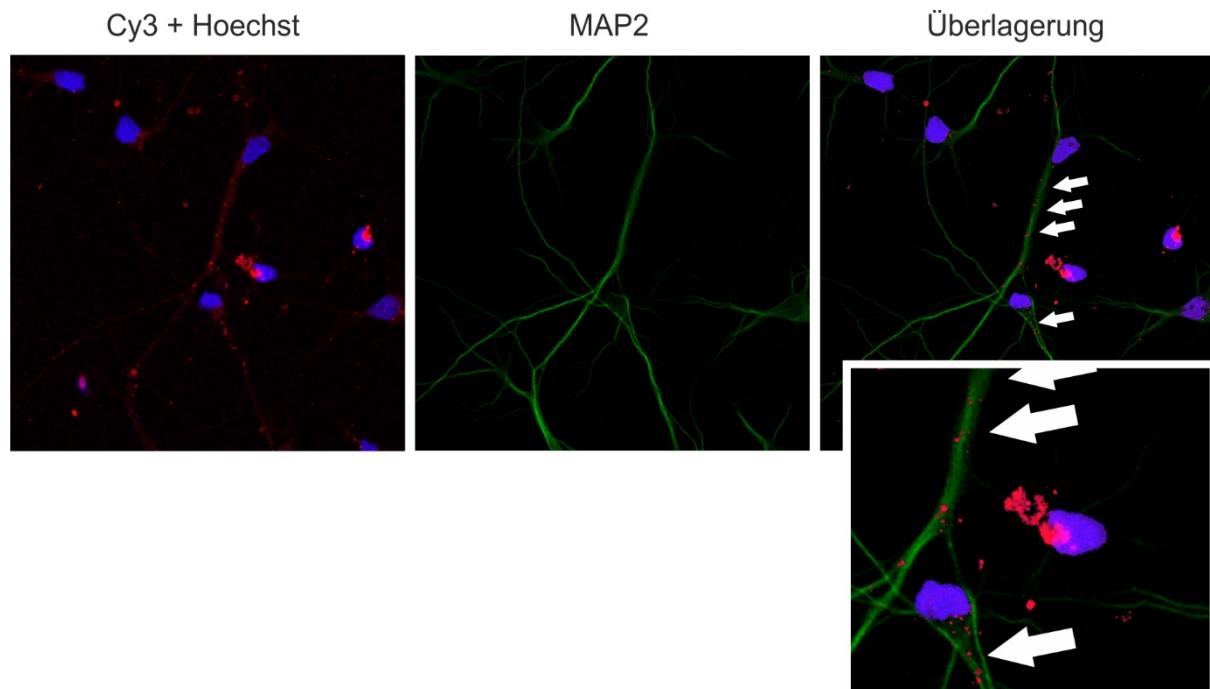


Abb. 4.2.5: Repräsentatives Bild einer mit Cy3-pre-134 transfizierten, neuronalen Primärzellkultur. rot: Cy3-pre-134. blau: Hoechst. grün: MAP2. Die Pfeile verweisen auf einzelne Fluoreszenzpunkte im Zellkörper oder in den Dendriten. unten rechts: vergrößerter Ausschnitt der Überlagerung.

Die Auswertung der Transfektion mit dual gelabelter Sonde Dab-pre-134-Ax633 ergab ebenfalls eine Anreicherung des Alexa633-Signals innerhalb der Zelle, wie auch die Überlagerung des Alexa633-Signals mit dem MAP2-Signal verdeutlicht. Auffallend waren hier eine Lokalisierung des Alexa633-Fluoreszenzsignals im Bereich des Zellkörpers und eine geringe Signalstärke im Bereich der Dendriten (Abb. 4.2.6, A, Pfeile). Dies wurde auch in der Auswertung der Z-Schicht-Bilder, welche die Aufnahmen von 9 aufeinanderfolgenden optischen Schichten zeigen, verdeutlicht. Die intrazelluläre Lokalisierung von Alexa633 konnte anhand der Schicht-Aufnahmen durch Überlappung mit dem MAP2-Signal gezeigt werden, indem das gemeinsame Auftreten beider Signale in den einzelnen Schichten beobachtet wurde (Abb. 4.2.6, B).

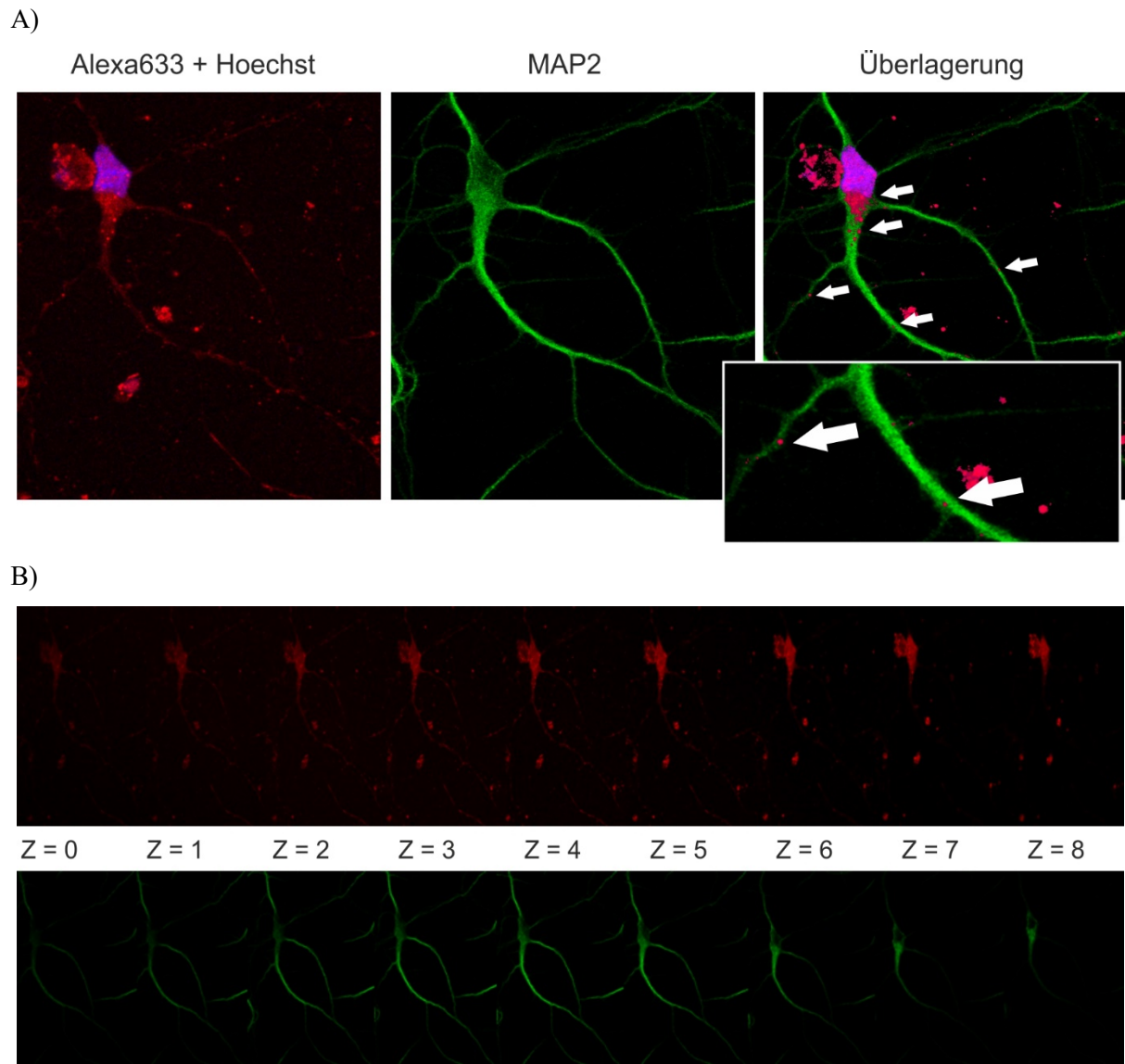


Abb. 4.2.6: Repräsentative Bilder einer mit Dab-pre-134-Ax633 transfizierten, neuronalen Primärzellkultur. rot: Alexa633, blau: Hoechst, grün: MAP2. Die Pfeile verweisen auf einzelne Fluoreszenzpunkte im Zellkörper oder in den Dendriten. A) Fluoreszenzsignale der dual gelabelten Sonde, einzeln und in Überlagerung dargestellt, unten rechts: vergrößerter Ausschnitt der Überlagerung. B) Aufnahme von 9 Z-Schicht-Bildern.

Da die hier gezeigten Aufnahmen von Neuronenzellen mit transfizierter dual gelabelter Sonde lediglich einen einzigen Zeitpunkt nach der Transfektion widerspiegeln, wurde zunächst nur eine Aussage über die erfolgreiche Anreicherung der Sonde in der Zelle getroffen. Das aufgenommene Fluoreszenzsignal der Sonde gab erste Hinweise auf eine erfolgte Spaltung durch Dicer. Eine andere Ursache für das beobachtete Fluoreszenzsignal könnte ein unzureichender Quencher-Effekt der Sonde unter den zellulären Bedingungen sein. Durch die zeitlich abhängige Bildgebung von lebenden Zellen (*live cell imaging*) oder die Fixierung der Zellen in zeitlichen Intervallen ab der Transfektion ist zu untersuchen, ob eine Veränderung des Alexa633-Fluoreszenzsignals über die Inkubationszeit vorliegt. In einer von Lee & Doudna^[52] veröffentlichten Arbeit zur TRBP-abhängigen Dicer-Aktivität *in vitro* wurde gezeigt, dass die Substratspaltung durch Dicer für verschiedene pre-miRNAs mit unterschiedlichen

Prozessierungsraten verlief. Dabei wurde jedoch für die meisten pre-miRNAs nach einer Inkubationszeit von 2 h ein Substratumsatz von über 60 % festgestellt. In Bezugnahme auf die Transfektionsexperimente der vorliegenden Arbeit, bei denen die Zellfixierung 2 h nach der Transfektion durchgeführt wurde, konnte demzufolge eine zumindest anteilig erfolgte Prozessierung der dual gelabelten Sonde in Betracht gezogen werden. Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei dem Alexa633-Fluoreszenzsignal um prozessierte pre-miRNA handelte, ließ die Lokalisierung des Signals im Zellkörper vermuten, dass der überwiegende Teil der dual gelabelten pre-miRNA im Zellkörper gereift war. Jedoch waren vereinzelte Fluoreszenzsignale ebenfalls in den Dendriten zu erkennen, die von einer lokalen Spaltung stammen konnten. Eine zeitabhängige Untersuchung könnte auch hier Aufschluss darüber geben, ob eine dendritische Prozessierung in Betracht gezogen werden kann.

Zusammenfassend wurde die Transfektion einer mono 5'-gelabelten und einer dual 3',5'-gelabelten Sonde der pre-miR-134 in neuronale Primärzellen gezeigt. Dafür wurde eine 5'-gelabelte Cy3-Sonde und eine gequenchete, dual 3',5'-gelabelte Dabcyl/Alexa633-Sonde durch Verwendung einer Kombination enzymatischer und chemischer Methoden hergestellt. Die *in-vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase und die Ligation mit der T4-RNA-Ligase-1 dienten als enzymatische Methoden. Als chemische Methoden wurde die CuAAC zum Labeling von RNA am 5'-Terminus eingesetzt. Auch ein kommerziell erworbenes Fluorophor-gelabeltes RNA-11-mer wurde verwendet.

Die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schratt angefertigten Fluoreszenz-Aufnahmen mit den genannten Sonden in Neuronen zeigten, dass die Transfektion erfolgreich war und die Sonden in den Neuronen lokalisiert werden konnten. In Bezugnahme auf Transfektionsexperimente der Arbeitsgruppe Schratt^[135] mit unspezifisch, also zum Teil auch mehrfach Cy3-gelabelter pre-miR-134 wurde gezeigt, dass eine analoge, spezifisch und einfach gelabelte pre-miR-134-Sonde ebenso visualisierbar war und ausreichend sensitive Fluoreszenzaufnahmen lieferte. Obwohl es sich nur um Voruntersuchungen zur Lokalisierung der dual gelabelten Sonde Dab-pre-134-Ax633 handelte, konnten bereits erste Erkenntnisse zur miRNA-Reifung gewonnen werden. Das Auftreten eines Fluoreszenzsignals 2 h nach Einbringung der gequenchten Sonde durch Transfektion stand in Konformität mit bereits erwähnten Arbeiten zur Dicer-vermittelten Spaltung.^[52] Obgleich es sich dabei um *in-vitro*-Experimente handelte konnte eine Aussage über den Substratumsatz getroffen werden, der für die meisten pre-miRNAs nach 2 h bereits über die Hälfte fortgeschritten war.

Perspektivisch sind weiterführende Untersuchungen anzustreben, um eine Aussage über das Vorhandensein einer lokal stattfindenden Dicer-vermittelten Reifung von pre-miR-134 in den Dendriten der Neuronen zu treffen. Fluoreszenzaufnahmen ab dem Zeitpunkt der Transfektion in kurzen Zeitabständen mit konfokaler Mikroskopie an lebenden Zellen oder Zellfixierungen in kurzen Intervallen sind dafür notwendig. Die damit mögliche Untersuchung des Fluoreszenzsignals auf Veränderung der Intensität oder der Lokalisierung könnten Rückschlüsse auf eine lokale Prozessierung von pre-miR-134 zulassen.

Als eine Alternative zum Quencherpaar an den Termini der pre-miRNA besteht die Möglichkeit der Verwendung interner Markierungen, um beide Stränge des Stammbereiches mit zwei unterscheidbaren Fluorophoren auszustatten. Damit wäre eine Beobachtung der Migration der beiden miRNA-Stränge möglich, von denen nur ein Strang vom RISC geladen und für posttranskriptionelle Regulationsmechanismen weitertransportiert würde. Auch die Markierung des *Loop*-Bereiches mit einem Fluorophor und des Leitstranges der späteren miRNA mit einem zweiten, unterscheidbaren Fluorophor stellen weiterführende Untersuchungsansätze dar. Damit könnte die Migration der zwei unterschiedlichen Fluorophore und ihrer zugehörigen Komponenten nach der Reifung beobachtet werden. Die Untersuchung der Lokalisierung der jeweiligen Fluoreszenzsignale in den Neuronen würde wiederum Erkenntnisse über Transport und Prozessierung von pre-miR-134 bzw. miR-134 ermöglichen.

4.3 BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungs-Assay

Der Ago2-vermittelte Spaltungsschritt, der sich der miRNA-Reifung anschließt, ist einer der posttranskriptionellen Regulationsmechanismen und stellt einen möglichen Interventionspunkt für potentielle Inhibitoren dar (Abb. 2.2.1). Eine Methode diesen Schritt *in vitro* zu simulieren, ist über den Einsatz eines sogenannten *minimal RISC*, der aus rekombinantem Ago2 und reifer, einzelsträngiger miRNA besteht. Dieser ist in der Lage, ein RNA-Substrat komplementär zu binden und zu spalten, was in verschiedenen Arbeiten bereits zur Anwendung kam.^[107, 205]

Eine neue Möglichkeit der Detektion des Ago2-Spaltungsschrittes bietet die Anwendung der *branched rolling-circle amplification* (BRCA). Ein BRCA-Assay beruht auf der Extensionsreaktion eines Primers an einem zirkulären DNA-Templat.^[87, 89] Bereits für den Dicer-vermittelten miRNA-Reifungsschritt konnte gezeigt werden, dass die BRCA-basierende Detektion, in der ein Strang der reifen miRNA als Primer fungierte, möglich war.^[83] Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit zur Etablierung eines BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays genutzt. Dabei wurde ein zweistufiges Modell angewendet, bestehend aus dem Ago2-vermittelten Spaltungsschritt und dem BRCA-basierenden Detektionsschritt (Abb. 4.3.1). Im Spaltungsschritt wurde der bereits erwähnte *minimal RISC* eingesetzt, der ein mRNA-ähnliches Substrat (kurze, komplementäre Einzelstrang-RNA) schneidet. Der *minimal RISC* bestand aus rekombinantem, humanem Ago2 (rhAgo2) und einzelsträngiger, reifer miR-122 (Leitstrang, der von Ago2 inkorporiert wird). Im Detektionsschritt diente dann das durch Spaltung entstandene, neue 3'-Ende des RNA-Spaltproduktes als Primer für die BRCA-Reaktion. Die Amplifikation wurde von einer DNA-Polymerase ausgeführt. Im Gegensatz zum Spaltprodukt konnte das 3'-Ende des ungeschnittenen mRNA-ähnlichen Substrates nicht als Primer fungieren, da dieses 3'-Ende nicht komplementär zum zirkulären DNA-Templat war. Somit konnte das ungeschnittene Substrat nicht von der Polymerase verlängert werden, insofern diese keine Exonuklease-Aktivität besitzt. Es wurde die *Large Fragment Bst DNA Polymerase* verwendet, welche diese Voraussetzung erfüllt. Zusätzlich wurde ein DNA-Primer (Sekundärprimer) eingesetzt, der komplementär zum generierten Concatamer ist, um die DNA-Amplifizierung zu verstärken. Die Reaktion wurde in einer 96-Well-qPCR-Platte durchgeführt. Die Detektion des Amplikons erfolgte während der Amplifizierung mit *SYBR Gold* anhand eines ansteigenden Fluoreszenzsignals. Je mehr Amplikon gebildet wurde, umso stärker war der Fluoreszenzanstieg. Zur Analyse wurde der Fluoreszenzanstieg der Detektionskurve im initialen, linearen Bereich bestimmt.

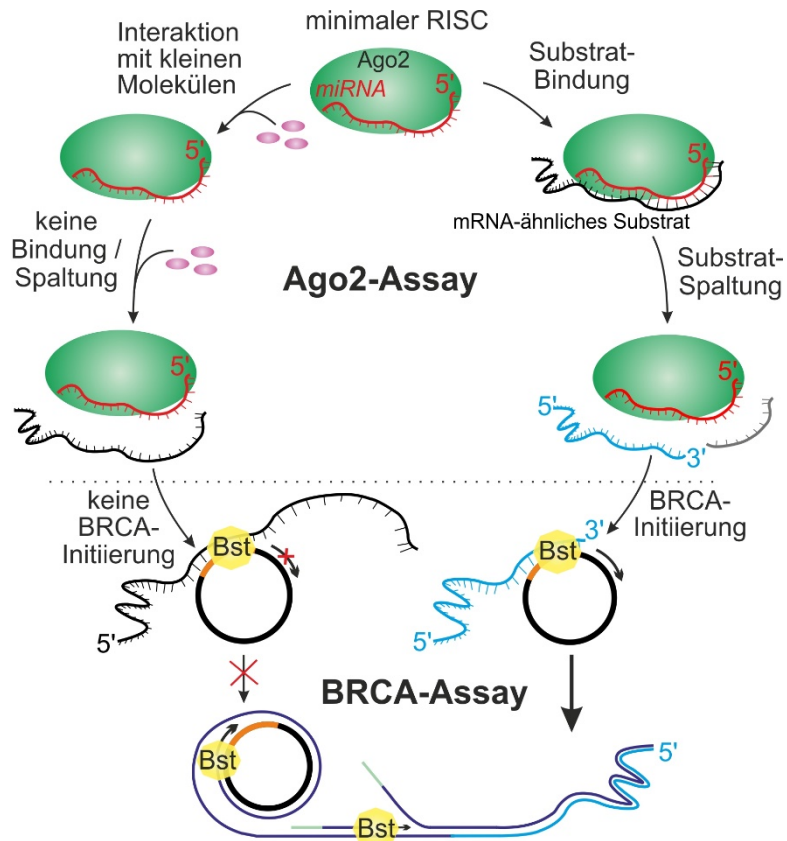


Abb. 4.3.1: Prinzip des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays. Der obere Teil repräsentiert den ersten Schritt, in welchem die Spaltung von einem RNA-Substrat und die Testung potentieller Inhibitoren stattfinden. Der untere Teil zeigt den Detektions-Schritt, in welchem ein Fluoreszenzanstieg beobachtet werden kann, wenn gespaltenes Substrat vorhanden ist (BRCA-Initiierung). Wird die Spaltung inhibiert, kann die BRCA-Reaktion nicht beginnen, da das nicht geschnittene 3'-Ende des Substrates inkompatibel zu dem zyklichen DNA-Templat ist. Somit kann die Polymerase, welche keine Exonuklease-Aktivität besitzt, ihre Polymerisation nicht starten (keine BRCA-Initiierung). Bst: Bst DNA-Polymerase (*Large Fragment*). BRCA: *branched rolling-circle amplification*. Ago2: Argonaut 2.

Um den Bezug zwischen PAGE als bekannter Detektionsmethode des Ago2-Spaltungsschrittes und der zu etablierenden BRCA-Methode herzustellen, wurden einige Vorversuche durchgeführt, die zum einen ein fluorogen gelabeltes Substrat mit PAGE und BRCA untersuchten. Zum anderen wurde ein ungelabeltes Substrat entwickelt, welches aus Vergleichs- und Anschaulichkeitsgründen zunächst über PAGE-Detektion untersucht wurde, jedoch primär als Test-Substrat (mRNA-ähnliches Substrat) zur Etablierung des BRCA-Assays diente.

4.3.1 Vorversuche zum Ago2-vermittelten Spaltungsassay mit gelabeltem und ungelabeltem Substrat

Zur Untersuchung der Detektionsmethode via PAGE und deren Praktikabilität bezüglich des Ago2-vermittelten Spaltungsassays, aber auch um eine Brücke zur alternativen Detektionsmethode BRCA zu schlagen, wurden fluorogen gelabelte Substrate hergestellt (Abb. 4.3.2). Dazu wurde ein RNA-Einzelstrang, der komplementär zur gewählten Test-miRNA miR-122 war, mit einem Fluorophor am 3'-Ende versehen. Es wurden zwei Strategien zur Generierung von zwei unterschiedlichen Test-

Substraten entwickelt: a) über die Ligation eines pUp^{Alk} an ein RNA-Templat mit anschließender CuAAC eines Cy3-Azides. b) über die Ligation eines 11nt-Alexa633-RNA-Einzelstranges mit dem Alexa633-Fluorophor am 3'-Terminus an ein RNA-Templat.

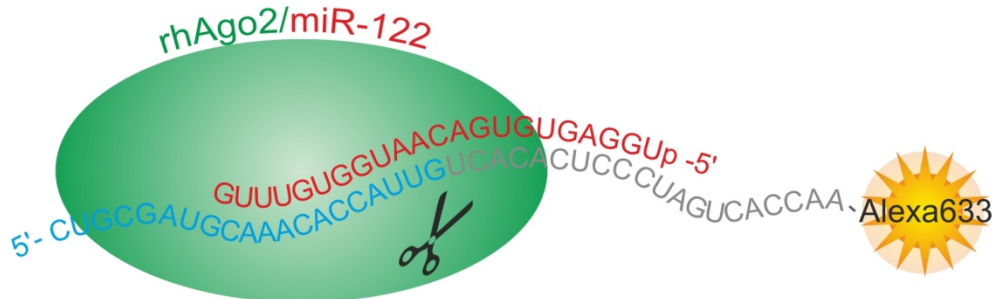


Abb. 4.3.2: Schematische Darstellung der Ago2-vermittelten Spaltung des Alexa633-gelabelten Substrates nach Inkorporation durch den rhAgo2/miR-122-Komplex.

Die Ligation erfolgte mit der T4-RNA-Ligase-1 und für Strategie a) mit anschließender CuAAC. Nach Aufarbeitung wurde die Abtrennung der Fluorophor-gelabelten von der ungelabelten RNA mit HPLC durchgeführt. Der nach Aufarbeitung und Konzentrationsbestimmung erfolgte Auftrag auf ein PA-Gel zeigte das RNA-Templat vor der Ligation, das ligierte Substat-11nt-Alexa633 (Sub-Ax633) und das ligierte Substrat-pUp-Cy3 (Sub-Cy3, Abb. 4.3.3). Nach HPLC-Reinigung war Sub-Ax633 mit einer geringen Menge an nicht-ligiertem Substrat verunreinigt (Spur 5 und 6, Abb. 4.3.3). Im Vergleich der OD-Werte unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten für die gegebene RNA bei 260 nm und für den jeweiligen Fluorophor bei entsprechender Wellenlänge wurde für Sub-Ax633 eine Verunreinigung von ca. 10 % ermittelt.

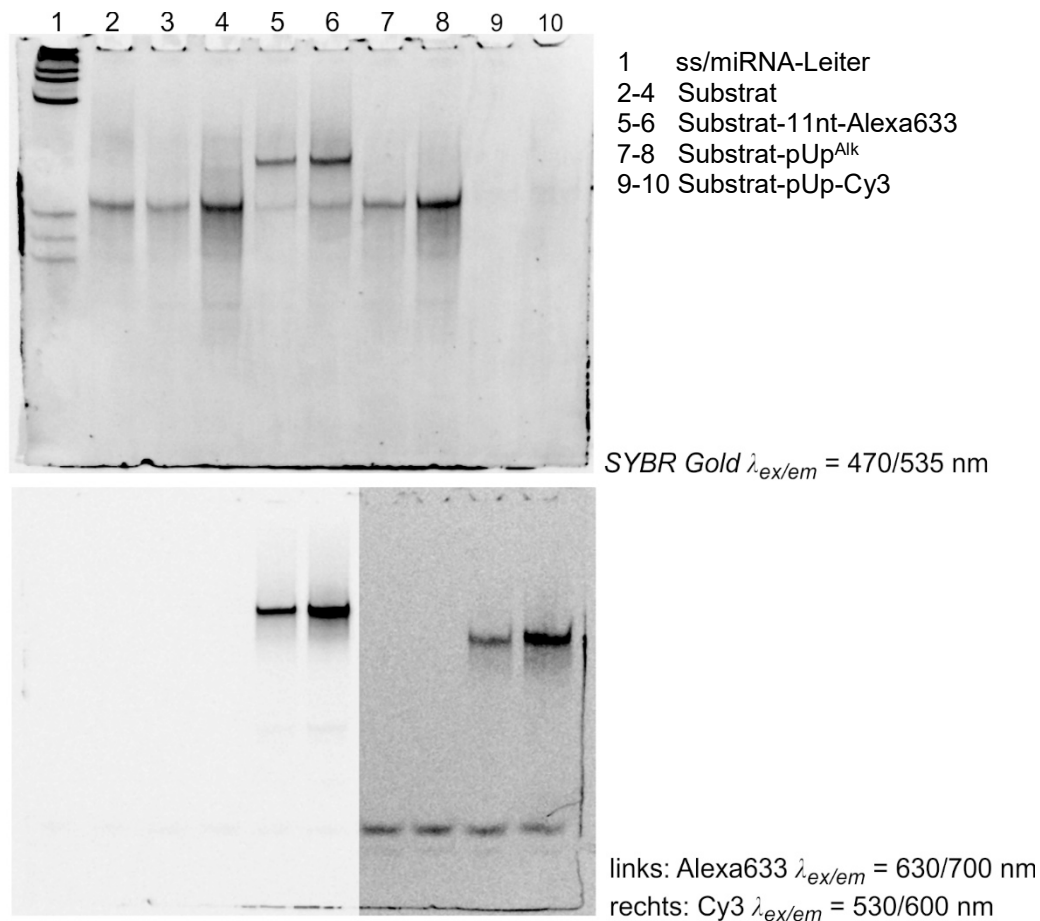


Abb. 4.3.3: Modifizierung des mRNA-ähnlichen Substrates für den Ago2-vermittelten Spaltungsassay. Denaturierende PA-Gele (20 %) zeigen das Substrat vor und nach Ligation einer 11nt-Alexa633-RNA bzw. nach Ligation von pUp^{Alk} mit anschließender CuAAC mit einem Cy3-Azid nach HPLC-Reinigung.

Da für das Substrat Sub-Ax633 eine höhere Ausbeute der Ligation erreicht wurde als für Sub-Cy3 (4 % und 1,5 %), wurde mit ersterem die Detektion des Ago2-vermittelten Spaltungsassays auf denaturierendem PA-Gel durchgeführt (Anhang, Abb. 8.3). Die Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen mit 40 nM rhAgo2, 100 nM miR-122 und 100 nM Substrat, in Anlehnung an bereits veröffentlichte Arbeiten.^[107, 205] Nach einer Reaktionszeit von 60 min bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz auf ein denaturierendes PA-Gel aufgetragen (Abb. 4.3.4). Im Reaktionsansatz mit Sub-Ax633 (Spur 5, Pfeil) wurde eine dünne Bande beobachtet, die dem Spaltprodukt (20nt-Alexa633) entsprach. Der Vergleich mit dem Reaktionsansatz ohne Sub-Ax633 zeigte nach Färbung mit *SYBR Gold* ebenfalls, dass nur eine sehr geringe Menge an Spaltprodukt gebildet wurde, da keine Veränderung der Bandenintensität im zu erwartenden Bereich erkennbar war (Abb. 4.3.4, vgl. Spur 4 und 5).

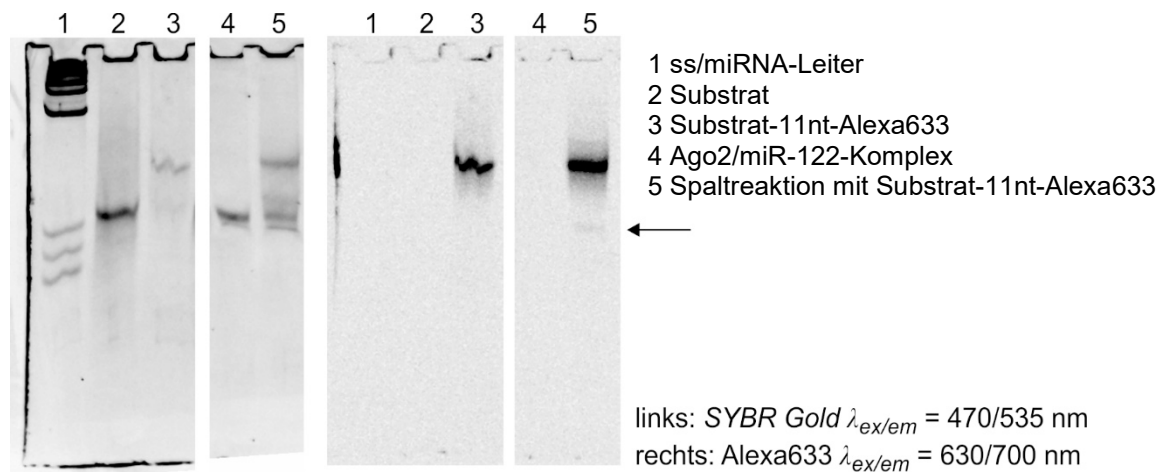
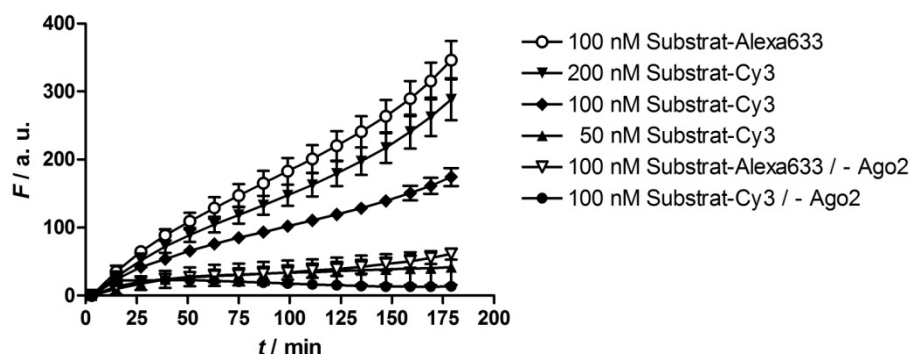


Abb. 4.3.4: Ago2-vermittelter Spaltungsassay für denaturierendes PA-Gel (20 %). Für die Gelanalyse wurden 100 nM des Alexa633-gelabelten Substrates eingesetzt. Spur 3 zeigt das gelabelte Substrat (40 nt). Spur 4 zeigt den rhAgo2/miR-122-Komplex. Spur 5 zeigt den Komplex aus Spur 4 mit Substrat nach der Spaltungsreaktion. Pfeil: Laufweite der Bande des Spaltproduktes (20+20 nt).

Um erneut zu testen, ob eine Spaltung des Substrates Sub-Ax633 stattgefunden hat, wurde die Detektion mithilfe des BRCA-Assays durchgeführt. Ebenso wurde das zweite Substrat Sub-Cy3 getestet. In der Tat konnte hier für beide Substrate ein moderater, jedoch deutlich erkennbarer Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden (Abb. 4.3.5, A). Die Reaktion mit Sub-Cy3 in verschiedenen Substratkonzentrationen zeigte einen zunehmenden Fluoreszenzanstieg mit zunehmender Konzentration. Es konnte gezeigt werden, dass vermutlich eine Spaltungsreaktion stattgefunden hat. Auffällig war zum einen der sehr geringe Anstieg im linearen Bereich von maximal 4 min^{-1} , zum anderen ergaben die Spaltungsreaktionen der beiden Substrate bei gleicher verwendeter Konzentration einen unterschiedlichen Anstieg (Abb. 4.3.5, B). Für Sub-Ax633 lag im Vergleich zu Sub-Cy3 ein höherer Anstieg unter gleichen Reaktionsbedingungen vor. Da die Kurvenanstiege jedoch in einem engen Bereich lagen, könnten geringe Konzentrationsunterschiede beispielsweise durch nicht abtrennbare Verunreinigungen ein möglicher Grund für die Unterschiedlichkeit der Anstiege sein. Ebenso könnten diese Ergebnisse darauf schließen lassen, dass ein mit Fluorophor am 3'-Ende gelabeltes Substrat möglicherweise von rhAgo2 mit geringerer Aktivität geschnitten wurde, als ein ungelabeltes. Darauf basierend könnte ein unterschiedlich hoher Fluoreszenzanstieg zwischen Sub-Ax633 und Sub-Cy3 unter gleichen Reaktionsbedingungen darauf hinweisen, dass mit größerer Entfernung des Fluorophors von der Schnittstelle die Attraktivität des Substrates für das Enzym zunahm.

A)



B)

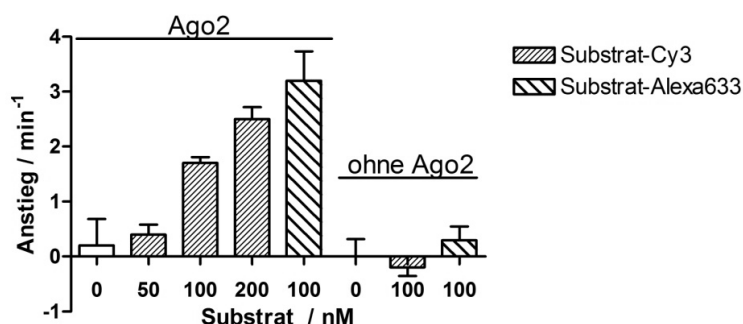


Abb. 4.3.5: BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungsassay mit 3'-Fluorophor-gelabeltem Substrat.

A) Fluoreszenzanstieg im BRCA-Detektionsschritt mit (▲) 50 nM, (◆) 100 nM, und (▼) 200 nM Cy3-gelabeltem Substrat sowie (○) 100 nM Alexa633-gelabeltem Substrat im Ago2-vermittelten Spaltungsassay. Kontrollen zeigen den Anstieg nach Inkubation ohne rhAgo2 mit 100 nM (▽) Alexa633- und (●) Cy3-gelabeltem Substrat. Mittelwerte im Triplikat \pm SD. B) Fluoreszenzanstieg im linearen Bereich für Cy3- bzw. Alexa633-gelabeltes Substrat in verschiedenen Konzentrationen sowie in Abwesenheit von rhAgo2.

Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe des BRCA-Assays als Detektionsmethode auch geringe Spaltproduktmengen detektierbar waren. Zur weiteren Etablierung und Untersuchung des BRCA-Assays bezüglich der Ago2-vermittelten Spaltungsreaktion wurde ein ungelabeltes Substrat mit der T7-Transkription erstellt (Abb. 4.3.6, im Ago2/miR-122-Komplex). Dabei wurde die notwendige, zu miR-122 komplementäre Sequenz eingearbeitet und ebenso wurde darauf geachtet, dass am 3'-Ende keine Komplementarität zum zirkulären DNA-Templat des BRCA-Assays vorhanden war. Ein verlängertes 3'-Ende, mit resultierender Substratlänge von 52 nt, sollte neben einer guten Handhabung bei der Transkriptions-Aufarbeitung gewährleisten, dass möglichst geringe unspezifische Reaktionen im Bereich des 3'-Endes während des BRCA-Assays ablaufen. Um die Funktionalität des erstellten Substrates mit etablierten Methoden zu testen, wurde vor dem Einsatz im BRCA-Assay, die Substrat-Spaltung durch rhAgo2 mit PA-Gelanalyse ausgewertet. Die Länge des Substrates von 52 nt ergab ein Spaltungsprodukt von 22 nt + 30 nt. Besonders die Bande mit der gut differenzierbaren Länge von 30 nt konnte im Gel eindeutig identifiziert werden, da keine Überlappung mit der miR-122-Bande vorlag. Aufgrund des aus den vorhergehenden Experimenten mit gelabeltem Substrat erwarteten geringen Substratumsatzes und der rhAgo2-Herstellerangaben, wurde für die PAGE-Analyse der Spaltungsreaktion eine Substratkonzentration von 500 nM gewählt. Für den Vergleich der Reaktion

unter verschiedenen Bedingungen wurde eine Enzymkonzentration von 10 nM bzw. 40 nM verwendet, sowie eine Konzentration an miR-122 von 0 nM, 50 nM und 100 nM. Zum weiteren Vergleich der Spaltungsreaktion mit den Ausgangsstoffen, wurden diese nochmals einzeln auf das PA-Gel aufgetragen, und zwar 500 nM des Substrates und jeweils 600 nM bis 50 nM an miR-122 (Abb. 4.3.7, Spur 8 und Spuren 9). Die Spaltungsreaktion zeigte, dass unter Verwendung von 100 nM miR-122 eine Bande zu erkennen war, die dem 30-nt-Spaltprodukt entsprach. Bei Einsatz von 0 nM und 50 nM an miR-122 ist diese Bande nicht oder nur sehr schwach zu erkennen (Abb. 4.3.7, Spuren 2, 3 und 7, 8). Die als Vergleichsspuren aufgetragenen Mengen an miR-122 und Substrat verdeutlichen, dass die entstandene Bande mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Produkt der Spaltungsreaktion darstellt. Damit konnte gezeigt werden, dass eine rhAgo2-vermittelte Spaltungsreaktion mit dem aus T7-Transkription gewonnenen Substrat möglich ist. Daraufhin wurden Untersuchungen zur Etablierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays mit diesem Substrat durchgeführt.

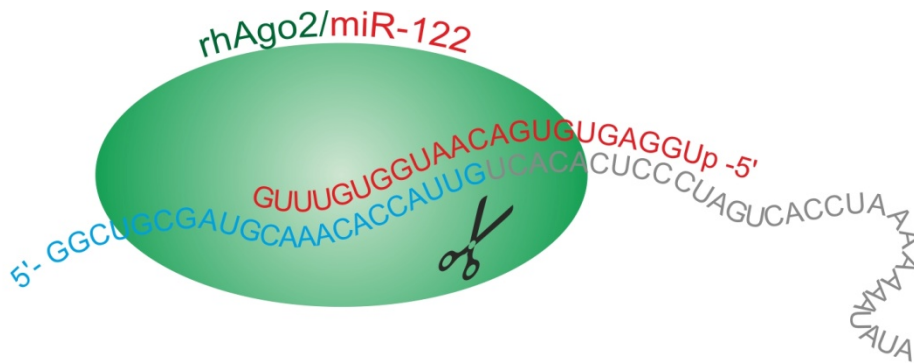
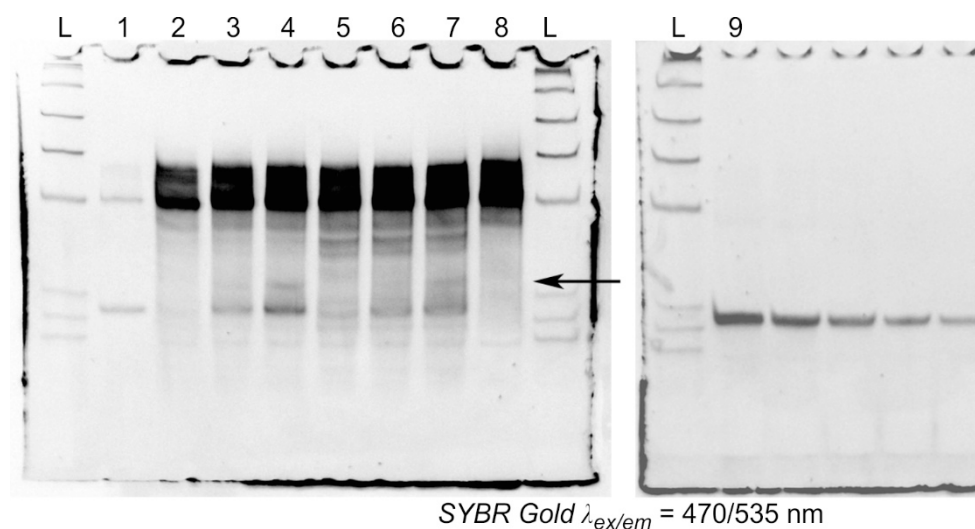


Abb. 4.3.6: Spaltung des mRNA-ähnlichen Substrates. Schematische Darstellung des miRISC aus miR-122 und rekombinantem, humanem Ago2 (rhAgo2) sowie inkorporiertem Substrat mit angedeuteter Schnittstelle (Schere). Das rot gezeichnete Fragment des gespaltenen Substrates dient als Initiator im BRCA-Assay.



- L ss/miRNA-Leiter
 1 50 nM Substrat + 50 nM miR-122
 2 500 nM Substrat, 10 nM rhAgo2, 0 nM miR-122
 3 500 nM Substrat, 10 nM rhAgo2, 50 nM miR-122
 4 500 nM Substrat, 10 nM rhAgo2, 100 nM miR-122
 5 500 nM Substrat, 40 nM rhAgo2, 0 nM miR-122
 6 500 nM Substrat, 40 nM rhAgo2, 50 nM miR-122
 7 500 nM Substrat, 40 nM rhAgo2, 100 nM miR-122
 8 500 nM Substrat
 9 miR-122, 600 nM - 50 nM

Abb. 4.3.7: Ago2-vermittelter Spaltungsassay für denaturierendes PA-Gel (20 %). Für die Gelanalyse wurden 500 nM des mRNA-ähnlichen Substrates aus der T7-Transkription eingesetzt. Ebenso wurde die Menge an rhAgo2 und miR-122 variiert. Pfeil: Laufweite der 30-nt-Bande des Spaltproduktes (30 + 22 nt). Spur 2 zeigt Substrat (52 nt) und miR-122 (22 nt) in geringer Menge zum Größenvergleich. Spur 8 zeigt 500 nM des Substrates analog zu den Reaktionsansätzen. rechts: Denaturierendes PA-Gel (20 %) mit verschiedenen Mengen miR-122, zusammengefasst als Spur 9.

4.3.2 Etablierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays

Da die generelle Funktion des BRCA-Assays als Detektionsmethode im Ago2-vermittelten Spaltungsassay in den Vorversuchen gezeigt wurde, erfolgte nun die Etablierung mit dem bereits erwähnten, ungelabelten, aus T7-Transkription generierten Substrat. Zur Bestimmung der optimalen Substratkonzentration in Bezug auf das Detektionssignal wurden zunächst unterschiedliche Substratkonzentrationen bei gleicher Enzymmenge (40 nM) verwendet (Abb. 4.3.8, A). Der stärkste Anstieg des Fluoreszenzsignales war bei 100 nM Substrat-konzentration zu beobachten, wohingegen höhere Konzentrationen einen geringeren Anstieg zeigten. Kontrollreaktionen mit den höchsten Substratkonzentrationen in Abwesenheit von rhAgo2 zeigten keinen relevanten Anstieg. Das bei der BRCA-Reaktion entstehende Amplikon wies nach Auftrag auf ein PA-Gel ein charakteristisches stufenartiges Bandenmuster auf (Abb. 4.3.8, B, roter Rahmen). Entsprechend der gemessenen Anstiege war dieses Muster bei der Substratkonzentration von 100 nM am Stärksten ausgeprägt. Im unteren Teil des PA-Gels sind die Banden der weiteren Komponenten des rhAgo2-vermittelten Spaltungsassays und des BRCA-Assays zu erkennen: die zum Spaltungsassay gehörende miR-122 (blauer Rahmen) und das

Substrat (grüner Rahmen), die im BRCA-Assay zugeführten Komponenten ssDNA-Templat (gelber Rahmen) und der Sekundärprimer (magenta Rahmen, alle in Abb. 4.3.8, B). Für das ssDNA-Templat sind zwei Banden entsprechend des zyklisierten und nicht-zyklisierten Ligationsproduktes nach circLigase-Reaktion zu erkennen (Anhang, Abb. 8.4).

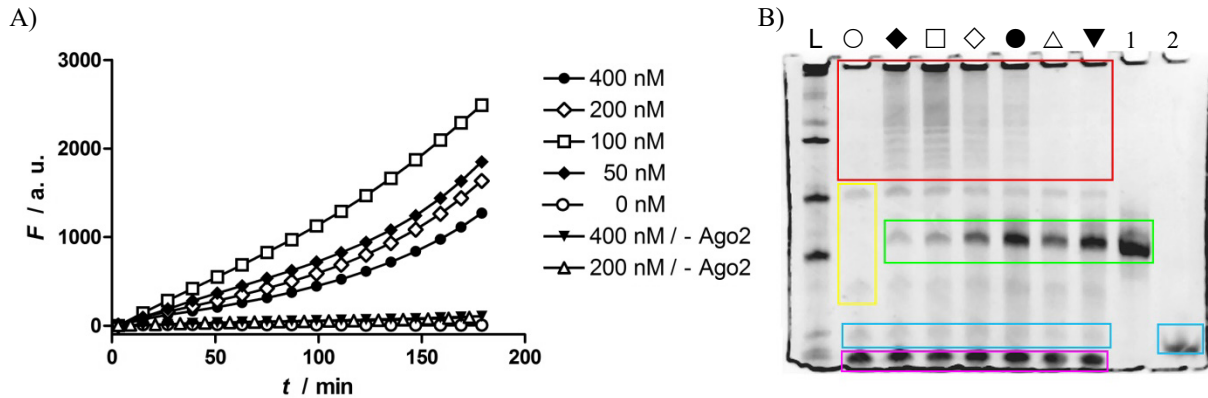


Abb. 4.3.8: BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungsassay unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. A) Fluoreszenzanstieg im BRCA-Detektionsschritt mit (○) 0 nM, (◆) 50 nM, (□) 100 nM, (◇) 200 nM, und (●) 400 nM mRNA-ähnlichem Substrat im Ago2-vermittelten Spaltungsassay. Kontrollen zeigen den Anstieg nach Inkubation ohne rhAgo2 mit (△) 200 nM und (▼) 400 nM Substrat. Mittelwerte im Triplikat. B) Denaturierendes PA-Gel (10 %) mit verschiedenen Aliquoten (je 10 µl) der BRCA-Reaktion. rot: Banden des Amplifikations-Produktes, die mit zunehmender Ago2-Inkubationszeit stärker hervortreten. gelb: zyklisiertes/nicht-zyklisiertes ssDNA-Templat (circLigase-Reaktion nicht vollständig). grün: mRNA-ähnliches Substrat. blau: miR-122. magenta: zweiter Primer aus BRCA-Ansatz. L: ss/miRNA-Leiter (NEB). 1: 800 nM Substrat. 10: 800 nM miR-122.

Die Auswertung der Fluoreszenzanstiege mehrere Reaktionen im initialen, linearen Bereich zeigte den höchsten Anstieg von ca. 20 min^{-1} bei einer Substratkonzentration von 100 nM (Abb. 4.3.9). Es wurde ebenso in Abwesenheit von rhAgo2 getestet, was einen sehr geringen Anstieg von maximal 2 min^{-1} ergab, wodurch veranschaulicht wurde, dass rhAgo2 für die Reaktion essentiell war.

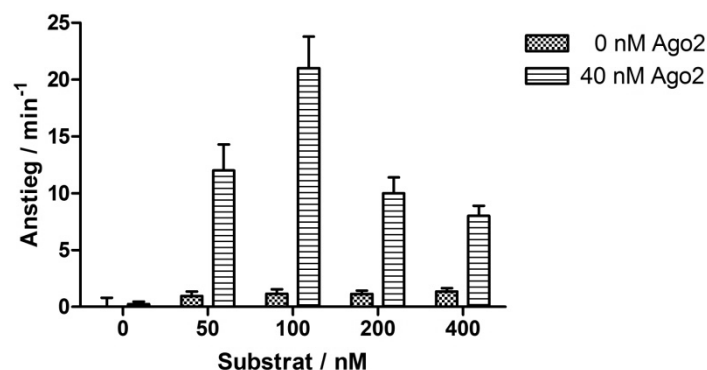


Abb. 4.3.9: BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungsassay unter Verwendung verschiedener Konzentrationen mRNA-ähnlichen Substrats. Es wurden Substrat-Konzentrationen von 0 nM bis 400 nM getestet. Kontrollen zeigen die Reaktion ohne rhAgo2 (0 nM Ago2) für die verschiedenen Substratkonzentrationen. Der Fluoreszenzanstieg wurde mithilfe des BRCA-Assays detektiert und der initiale Anstieg im linearen Bereich wurde bestimmt. Mittelwerte + SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat.

Um zu testen, ob der Assay zwischen verschiedenen Mengen an gebildetem Spaltprodukt unterscheiden konnte, wurde der rhAgo2/miR-122-Komplex mit 100 nM mRNA-ähnlichem Substrat unterschiedlichen Inkubationszeiten ausgesetzt, bevor der Fluoreszenzanstieg mit dem BRCA-Detektionsassay bestimmt wurde. Es wurde festgestellt, dass mit zunehmender Inkubationszeit im Spaltungsassay ein Anstieg im Fluoreszenzsignal zu beobachten war (Abb. 4.3.10, A). Die Kontrollreaktionen ohne miR-122 zeigten einen zu erwartenden geringen Anstieg. Zur Visualisierung des charakteristischen BRCA-Amplifizierungsmusters, wurde die BRCA-Reaktion auf ein denaturierendes PA-Gel aufgetragen (Abb. 4.3.10, B). Analog zum Fluoreszenzsignal im BRCA-Assay, konnte eine Erhöhung der Bandenintensität mit höherer Inkubationszeit im Spaltungsassay festgestellt werden. Entsprechend zeigten die Kontrollreaktionen ohne miR-122 nach 60 min Inkubationszeit kein und nach 120 min nur sehr schwaches Amplifikationsmuster. Um die Inkubationszeiten möglichst kurz zu halten und gleichzeitig das Hintergrundsignale zu minimieren, wurde eine Standard-Inkubationszeit im Spaltungsschritt von 60 min gewählt.

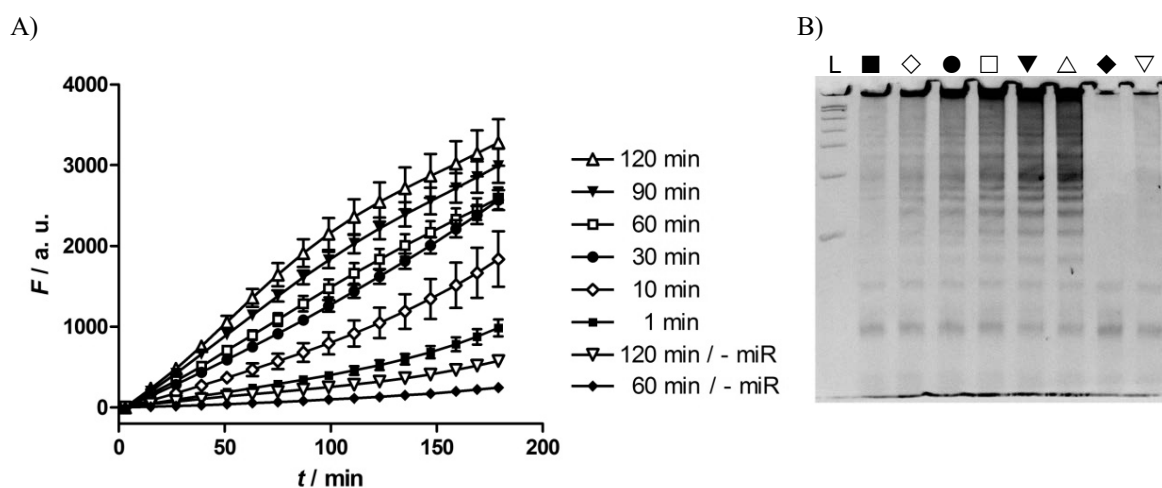


Abb. 4.3.10: BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungsassay unter verschiedenen Ago2-Inkubationszeiten. A) Fluoreszenzanstieg im BRCA-Detektionsschritt nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im Ago2-vermittelten Spaltungsassay: (■) 1 min, (◇) 10 min, (●) 30 min, (□) 60 min, (▼) 90 min, und (△) 120 min. Kontrollen zeigen den Anstieg nach Inkubation ohne miR-122 über (◆) 60 min und (▽) 120 min. Mittelwerte \pm SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat. Wenn nicht dargestellt, ist SD kleiner als die Symbolgröße. B) Denaturierendes PA-Gel (8 %) mit verschiedenen Aliquoten (je 10 μ l) der BRCA-Reaktion. Der obere Teil zeigt die Banden des Amplifikations-Produktes, die mit zunehmender Ago2-Inkubationszeit stärker hervortreten. Der untere Teil des Gels zeigt über alle Proben konstante Banden von zyklischem DNA-Templat und nicht-geschnittenem Substrat (siehe Erläuterung zu Abb. 4.3.8). Ago2-Inkubationszeiten: siehe Symbol-Erläuterungen unter A). L: 0,1-1 kb RNA-Leiter (*RiboRuler*).

Um den Übergang der mit der Inkubationszeit größer werdenden Fluoreszenzanstiege von der linearen Phase in ein Plateau zu dokumentieren, wurde über eine Inkubationszeit von 6 h gemessen. Aus den Fluoreszenzkurven zwischen 10 min und 360 min wurde der Anstieg im linearen Bereich bestimmt (Abb. 4.3.11, A) und gegen die Inkubationszeit im Spaltungsassay aufgetragen (Abb. 4.3.11, B). Auch nach 360 min stieg das Signal an, wobei der Anstieg langsam geringer wurde, das heißt vom linearen Verlauf abwich und ein mögliches Plateau erreichte. Die Kontrollreaktion ohne miR-122 zeigte nur nach

sehr langen Inkubationszeiten von 360 min einen sehr deutlichen Anstieg, der auf geringfügige unspezifische Spaltung in Abwesenheit von miR-122 hinwies (Abb. 4.3.11, B).

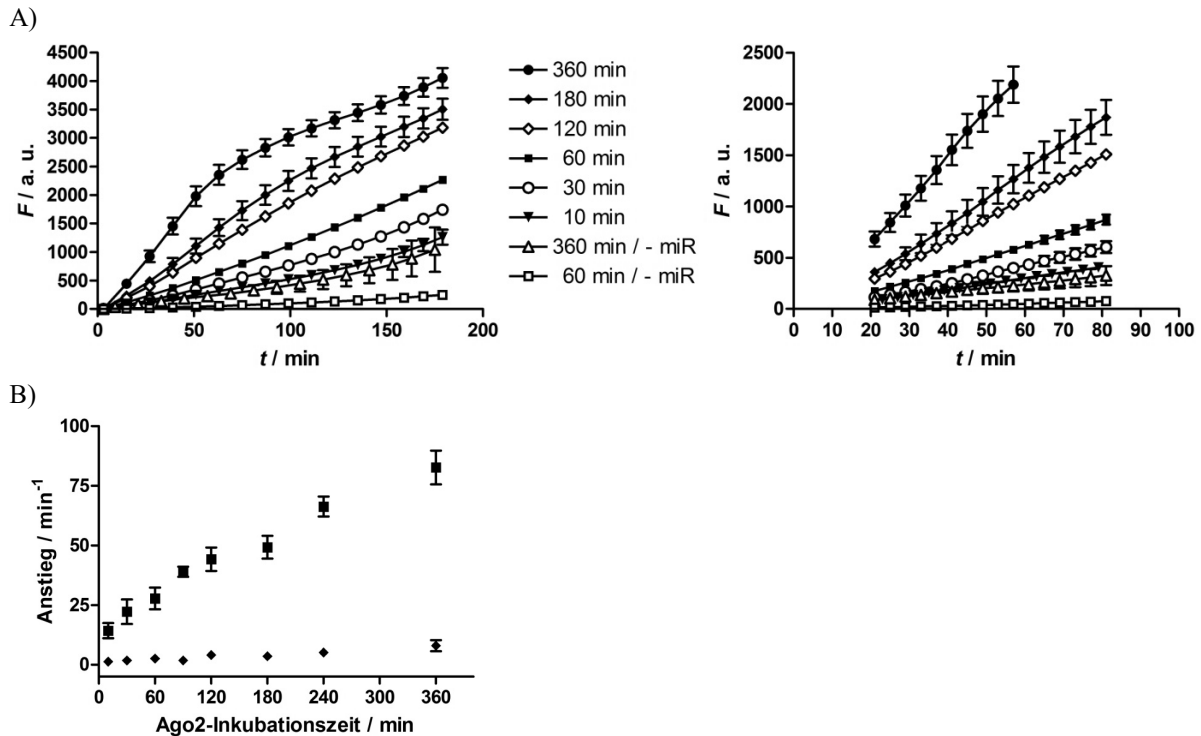


Abb. 4.3.11: BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungsassay unter verschiedenen Ago2-Inkubationszeiten über 360 min. A) Illustration der Bestimmung des Fluoreszenzanstieges. links: Fluoreszenzanstieg im BRCA-Detektionsschritt nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (10 min - 360 min) im Ago2-vermittelten Spaltungsassay. Kontrollen zeigen den Anstieg nach Inkubation ohne miR-122 über (□) 60 min und (△) 360 min. rechts: Der initiale lineare Bereich des Fluoreszenzanstieges wurde für die Bestimmung des Anstieges gewählt (gewöhnlich innerhalb der ersten 80 min). Mittelwert \pm SD. B) Berechneter Anstieg aus dem Fluoreszenzsignal im linearen Bereich vs. Ago2-Inkubationszeit. (■) Anstiege in Anwesenheit von miR-122 über 360 min. (◆) Anstiege in Abwesenheit von miR-122 über 360 min. Mittelwerte \pm SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat. Wenn nicht dargestellt, ist SD kleiner als die Symbolgröße.

Zur Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration in Bezug auf das Detektionssignal, wurden verschiedene Substrat-Konzentrationen unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an rhAgo2 von 5 nM bis 80 nM getestet. Für jede gewählte Substratkonzentration erhöhte sich der Anstieg mit zunehmender rhAgo2-Konzentration (Abb. 4.3.12). Unter Verwendung der höchsten rhAgo2-Konzentration in denaturierter Form konnte für alle Substratkonzentrationen nur ein sehr geringer Fluoreszenzanstieg festgestellt werden, was verdeutlichte, dass die Spaltaktivität tatsächlich vom Enzym abhängig war. Für die Detektion mit der BRCA war eine Enzymkonzentration im Bereich zwischen 20 nM und 80 nM geeignet. Es wurden 40 nM an rhAgo2 für die Standard-Reaktionsbedingungen gewählt. Für größere Screening-Testungen könnte aus Gründen der Wirtschaftlichkeit jedoch auch eine geringere Menge verwendet werden. Wie bereits beschrieben, zeigte die Untersuchung mit denaturiertem Enzym einen sehr geringen Fluoreszenzanstieg, analog zu den Reaktionsansätzen in Abwesenheit von Enzym. Deshalb wurde für zukünftige Experimente letztere

Variante, also in Abwesenheit des Enzyms, als Kontrollreaktion verwendet, um den Enzymverbrauch zu minimieren.

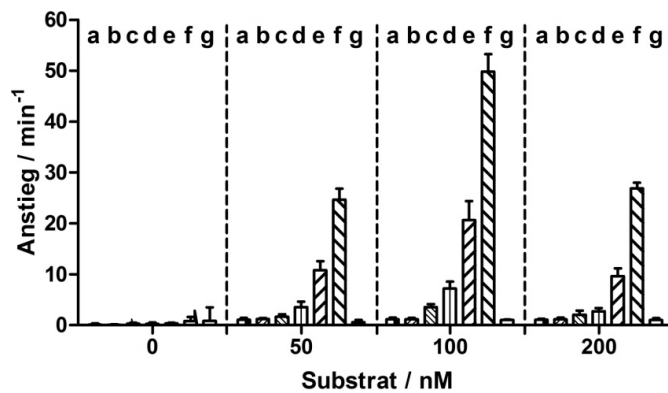


Abb. 4.3.12: Ago2-Aktivität im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay mit verschiedenen Substrat- und Ago2-Konzentrationen. Folgende Konzentrationen von rhAgo2 wurden eingesetzt: (a) 0 nM, (b) 5 nM, (c) 10 nM, (d) 20 nM, (e) 40 nM, (f) 80 nM und (g) 80 nM denaturiertes rhAgo2. Die Konzentrationen an mRNA-ähnlichem Substrat waren: 0 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM. Der Fluoreszenzanstieg wurde mit dem BRCA-Assay ermittelt und der Anstieg im linearen Bereich daraus bestimmt. Mittelwerte \pm SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat. Wenn nicht dargestellt, ist SD kleiner als die Symbolgröße.

Um den linearen Bereich der Reaktion zu ermitteln, wurde eine Kalibrierung mit synthetisiertem Spaltprodukt als Standard in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dabei konnte eine lineare Abhängigkeit des Fluoreszenzanstiegs während der BRCA-Reaktion von der Konzentration des Standards bis zu einer Konzentration von 20 nM festgestellt werden (Abb. 4.3.13, A, links). Für die Standardaddition wurde entsprechend bis zu 10 nM des Standards zugegeben und damit die Konzentration an Spaltprodukt bestimmt (Abb. 4.3.13, A, rechts). Dabei zeigte die Standardkalibrierung mit Matrix, jedoch ohne Enzym, im Vergleich zur Standardaddition einen ähnlichen Anstieg in der linearen Regression (Anhang, Abb. 8.5). Mit Hilfe der Standardaddition wurde berechnet, dass unter den verwendeten Assay-Standardbedingungen ca. 6 % von 100 nM mRNA-ähnlichem Substrat von 40 nM rhAgo2 innerhalb von 60 min geschnitten wurden (Abb. 4.3.13, B). Dieser Substratumsatz ließ darauf schließen, dass die Reaktionsbedingungen mit den Michaelis-Menten-Kriterien kompatibel und kinetische Messungen möglich sind. Der hier ermittelte Substratumsatz zeigte sich in Konformität zu dem Substratumsatz aus einer Arbeit von Rivas *et al.*^[74], der für die Substratreaktion von rhAgo2 mit einer einzelsträngigen siRNA und einem Substrat unter ähnlichen Reaktionsbedingungen ermittelt wurde. Darin wurde für eine Substratkonzentration von 7,5 nM eine Produktbildung von ca. 0,2 nM innerhalb von 180 min beobachtet. In der genannten Arbeit wurden außerdem kinetische Studien durchgeführt, die einen K_m -Wert von ca. 1,4 nM ergaben, der eine dem K_m -Wert von humanem RISC aus Zellextrakt ähnliche Größenordnung aufwies; und zeigten, dass der minimale RISC ähnliche kinetische Parameter besaß wie humaner RISC aus Zellextrakt. Die erfolgreiche Etablierung einer Kalibrierkurve mit linearem Bereich für geringe Produktmengen bis 10 nM und die Ermittlung von Substratumsätzen von ca. 6 % sind geeignete Voraussetzungen für kinetische Studien mit dem BRCA-

Assay. Dafür wäre eine Durchführung des Assays unter verschiedenen Substratkonzentrationen und verschiedenen Reaktionszeiten notwendig, um eine zeitliche Abhängigkeit der Produktbildung für verschiedene Substratmengen zu erhalten.

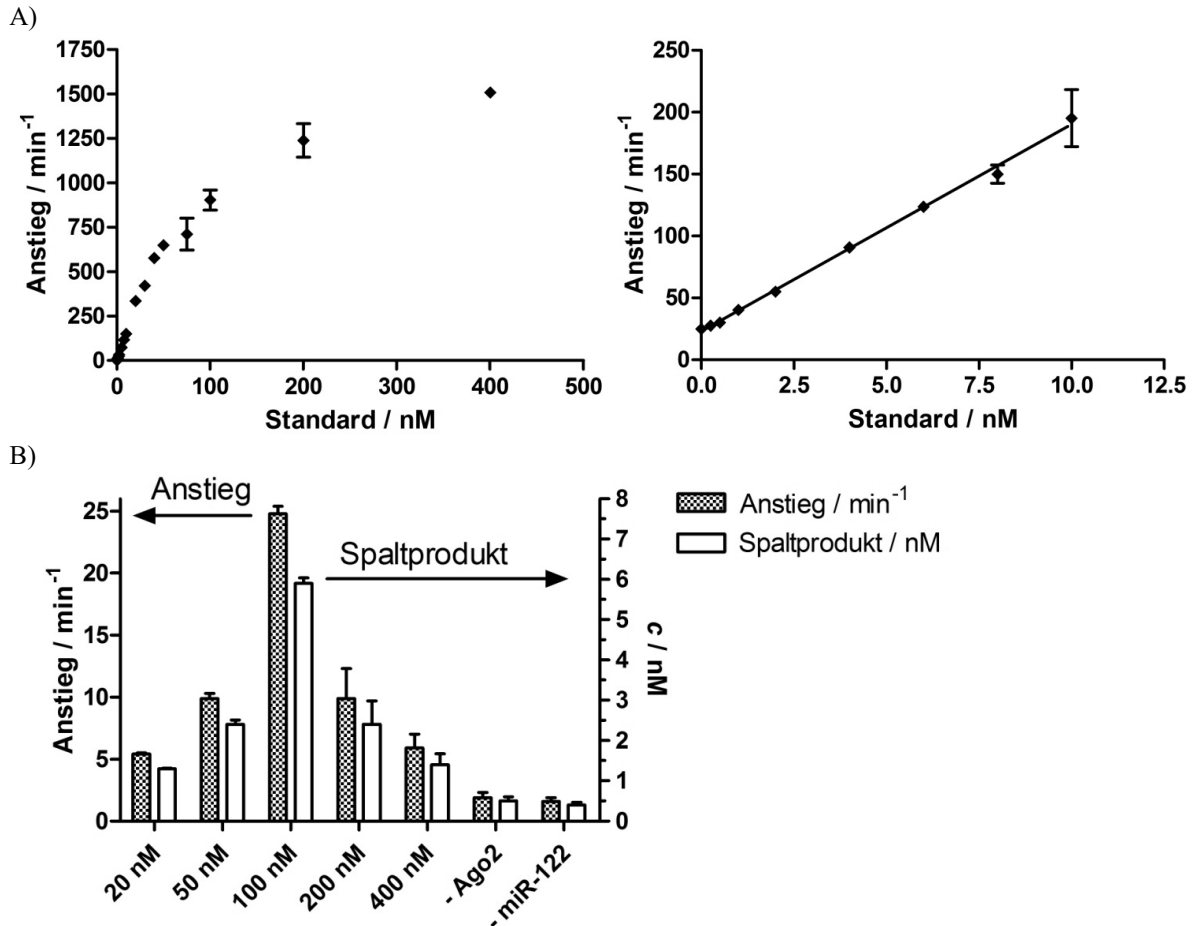


Abb. 4.3.13: Bestimmung der Konzentration an gespaltenem Substrat durch Kalibrierung im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungssassay. A) links: Kalibrierkurve mit 0,5 nM - 400 nM des Standards entsprechend dem als Primer fungierenden Spaltproduktes. Die Matrix wurde äquivalent zu den Standardreaktionsbedingungen im BRCA-Assay gewählt, jedoch ohne rhAgo2. rechts: Die Kalibrierkurve nach Standardaddition unter Standardreaktionsbedingungen einschließlich 100 nM Substrat im Ago2-Assay. Mittelwerte \pm SD. B) Vergleich des Anstieges im BRCA-Assay bei unterschiedlicher Substratkonzentration mit der Menge an über Standardaddition berechneten Spaltproduktes. - Ago2: Kontrollreaktion in Abwesenheit von rhAgo2. - miR-122: Kontrollreaktion in Abwesenheit von miR-122. Mittelwerte + SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat. Wenn nicht dargestellt, ist SD kleiner als die Symbolgröße.

Zur Verdeutlichung der Anwendbarkeit des vorgestellten Assays als Screening-Methode zur Identifizierung von Inhibitoren der Ago2-vermittelten mRNA-Spaltung, wurden Untersuchungen mit Substanzen aus der Gruppe der Aminoglykoside durchgeführt (Abb. 4.3.14, B). Dafür wurden die Substanzen Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Kanamycin A, Kanamycin B, Neomycin B und Neamin jeweils mit der Konzentration von 100 μ M im Ago2-vermittelten Spaltungsschritt inkubiert. Der Anstieg wurde dann im BRCA-Detektionsassay gemessen. Als individueller Normalisierungswert wurden Kontrollreaktionen für jede Testsubstanz durchgeführt. Dafür erfolgte die Zugabe der

Testsubstanz in entsprechender Konzentration zum BRCA-Assay, also erst nach der Inkubationszeit des Spaltungsschrittes unter Standardreaktionsbedingungen. Mit dem Vorhandensein eines Anstieges ähnlich der Positivkontrolle (Standardreaktionsbedingungen ohne Testsubstanz) wurde sichergestellt, dass mögliche Wechselwirkungen zwischen Matrix inklusive Testsubstanz und dem BRCA-System das Testergebnis nicht verfälschten. Ebenso wurde die Positivkontrolle, also eine Spaltungsreaktion gänzlich ohne Testsubstanz, also weder im Spaltungsassay noch im Detektionsassay, durchgeführt, um die Stabilität und Konstanz des Assays zu gewährleisten.

Auf diese Weise wurde die (verbleibende) rhAgo2-Aktivität unter Zugabe verschiedener Aminoglykoside in Prozent ermittelt (Abb. 4.3.14, A). Unter den getesteten sechs Aminoglykosiden zeigten Kanamycin B und Neomycin B den stärksten Effekt auf die rhAgo2-Aktivität. Sie minimierten diese signifikant auf ca. 60 % und ca. 30 %. Für Kanamycin A und Neamin wurde signifikant eine verbleibende rhAgo2-Aktivität von ca. 80 % festgestellt. Streptomycin und Dihydrostreptomycin zeigten keinen signifikanten Effekt. Die beiden stärksten Inhibitoren Kanamycin B und Neomycin B wurden zusätzlich in einem Konzentrationsbereich von 10 μ M bis 500 μ M gemessen (Anhang, Abb. 8.6). Dem Trend entsprechend, führte Kanamycin B bei einer Konzentration von nur 10 μ M zu einer Verminderung der Ago2-Aktivität auf ca. 85 % und Neomycin B zu einer Verminderung der Ago2-Aktivität auf ca. 55 %. Bei einer gemessenen Konzentration von 500 μ M wurde die Ago2-Aktivität für Kanamycin B auf ca. 40 % und für Neomycin B auf ca. 20 % minimiert. Dabei sank die Ago2-Aktivität für beide Aminoglykoside mit zunehmender Konzentration, wie anhand der Korrelation zwischen Inhibitormenge und Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass unter einer Gruppe von Testsubstanzen unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Ago2-System auftraten, und der Einfluss dieser Substanzen auf die Spaltungsreaktion mit dem BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay detektierbar war.

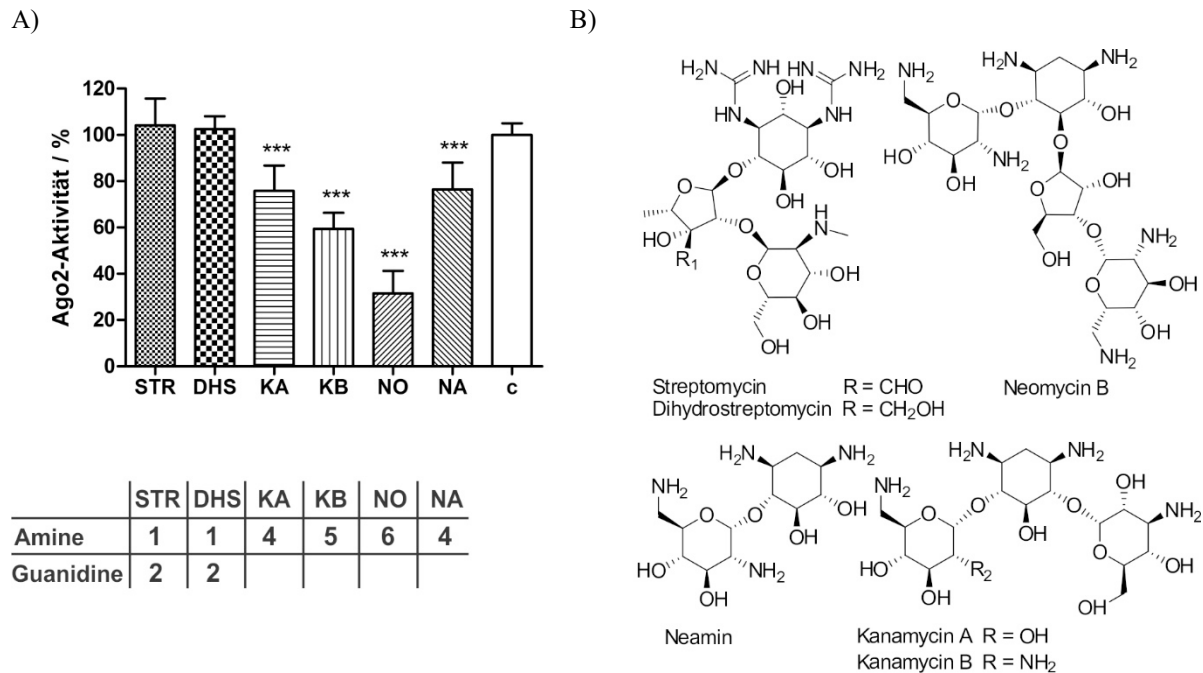


Abb. 4.3.14: Verschiedene Aminoglykoside, die im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay getestet wurden. A) Ago2-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Aminoglykosiden mit einer Konzentration von 100 μ M im Ago2-Spaltungs-Schritt. Mittelwerte + SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. *** $p < 0,0001$; c vs. KA, KB, NO, NA. STR: Streptomycin, DHS: Dihydrostreptomycin, KA: Kanamycin A, KB: Kanamycin B, NO: Neomycin B, NA: Neamin, c: Kontrolle ohne Testsubstanz. Tabelle: Vergleich der Anzahl der Aminogruppen und Guanidinogruppen der getesteten Aminoglykoside. B) Strukturen der getesteten Aminoglykoside.

Aminoglykoside sind eine vielfach verwendete Substanzgruppe zur Untersuchung von RNA-Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen. Die antibiotischen Eigenschaften von vielen Aminoglykosiden beruhen ebenfalls auf der Interaktion mit RNA, nämlich der ribosomalen RNA (rRNA).^[206] Einige Aminoglykoside binden an die 16S-rRNA, wodurch deren Interaktion mit tRNA und das korrekte Ablesen der mRNA gestört werden und der Zelltod herbeigeführt wird. Neben der Interaktion dieser Substanzgruppe mit rRNA besteht eine generell hohe Affinität von Aminoglykosiden gegenüber RNA.^[97] Eine bevorzugte Bindestelle für kleine Moleküle sind Schleifen und Ausbuchtungen, wie sie z. B. bei pre-miRNAs anzutreffen sind. Im Falle des Ago2-vermittelten Spaltungsassays fehlen diese Strukturmerkmale an relevanter Stelle, da es sich um eine komplementäre Bindung zwischen miRNA und Substrat-RNA handelt. Doch auch die Interaktion zwischen RNA und Protein stellt einen möglichen Interventionspunkt von Aminoglykosiden dar.^[97]

Die Betrachtung der elektrostatischen Wechselwirkungen lässt erkennen, dass RNA mit ihrem anionischen Phosphatrückgrat und der resultierenden negativen Ladung ein idealer Interaktionspartner für Aminoglykoside ist, die sich durch eine positive Ladung auszeichnen. Neben Faktoren wie pH-Wert und Salzkonzentration, welche die Ladung und die Interaktionsfähigkeit der Aminoglykoside beeinflussen können, wurde eine weitere einfache Korrelation festgestellt.^[97] Dabei konnte eine steigende Affinität der Bindung an RNA mit zunehmender Anzahl der Amine in den Aminoglykosiden demonstriert werden.^[206, 207] Zudem wurde beschrieben, dass eine Hydroxylgruppe in Proximität zur

Aminogruppe die Aminoglykosid-Nettoladung aufgrund des niedrigeren pKa-Wertes der Aminogruppe zusätzlich beeinflussen konnte.^[97, 208] Im hier gezeigten BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Reifungsassay weisen die Messergebnisse der sechs getesteten Aminoglykoside eine starke Korrelation bezüglich der Anzahl der Amine auf. Neomycin B mit sechs Aminogruppen konnte die Ago2-Aktivität stärker senken als Kanamycin B mit fünf Aminogruppen. Kanamycin A und Neamin zeigten untereinander ein ähnliches Verhalten und besaßen beide jeweils vier Aminogruppen. Streptomycin und Dihydrostreptomycin beeinflussten die Ago2-Aktivität mit jeweils einer Aminogruppe nicht. Diese beiden Substanzen besitzen jedoch jeweils zwei Guanidinogruppen, die Untersuchungen zufolge eine erhöhte RNA-Aminoglykosid-Bindung durch Erhöhung der Gesamtladung hervorrufen sollen.^[209] Ein solcher Einfluss konnte in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden. Möglicherweise reichte der Effekt der Guanidinogruppen nicht aus, um eine Veränderung der Ago2-Aktivität zu bewirken, wie im Vergleich mit dem vier Aminogruppen tragenden und nur gering inhibierenden Kanamycin A geschlussfolgert werden könnte. Die große Affinität von Aminoglykosiden zu RNA wird ebenfalls durch die Beobachtung der stöchiometrischen Verhältnisse zwischen den Interaktionspartnern beschrieben, die eine Bindung von mehr als einem Aminoglykosid-Molekül pro RNA-Molekül nahelegen.^[97] Die Aufgrund ihrer Unspezifität zu erwartende Bindung von Aminoglykosiden an RNA im mikromolaren Bereich konnte mit dem BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay bestätigt werden.^[207, 210] Hinzukommend deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass diese unspezifische Bindung sowohl miRNA als auch RNA-Substrat gleichermaßen betraf, wodurch der Anteil spezifisch bindender Moleküle nochmals geringer ausfiel.

Die Kristallstruktur von Ago2 mit miR-122 im Komplex zeigt die Lage der miRNA im Protein (Abb. 4.3.15). Das aktive Zentrum von Ago2 wurde durch Hervorhebung drei relevanter Aminosäuren in Rot gekennzeichnet (Abb. 4.3.15, rechts). Repräsentativ wurde Neamin maßstabsgetreu hinzugefügt. Unter theoretischer Betrachtung der Bindungsmöglichkeiten wird verdeutlicht, dass ein affines Aminoglykosid-Molekül aufgrund seiner Größe an mehreren Positionen an der miRNA binden kann. Nur einige dieser Bindungen, vermutlich in Proximität zum aktiven Zentrum, tragen wahrscheinlich zu einer Verminderung der Spaltungsaktivität bei. Die miRNA in Abb. 4.3.15 (rechts) ist dargestellt durch das elektrostatische Potential auf ihrer Oberfläche, wobei das Phosphatrückgrat als negativer Bereich blau dargestellt ist und zum Teil im Bild zu erkennen ist. Besonders im Bereich des aktiven Zentrums ist eine Interaktion zwischen negativem RNA-Bereich und den rot markierten Aminosäuren zu erkennen. Ausgehend von den auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Aminoglykosid und RNA könnte eine Störung der Ago2-RNA-Bindung in diesem Bereich zu einer Verminderung der Spaltungsaktivität führen.

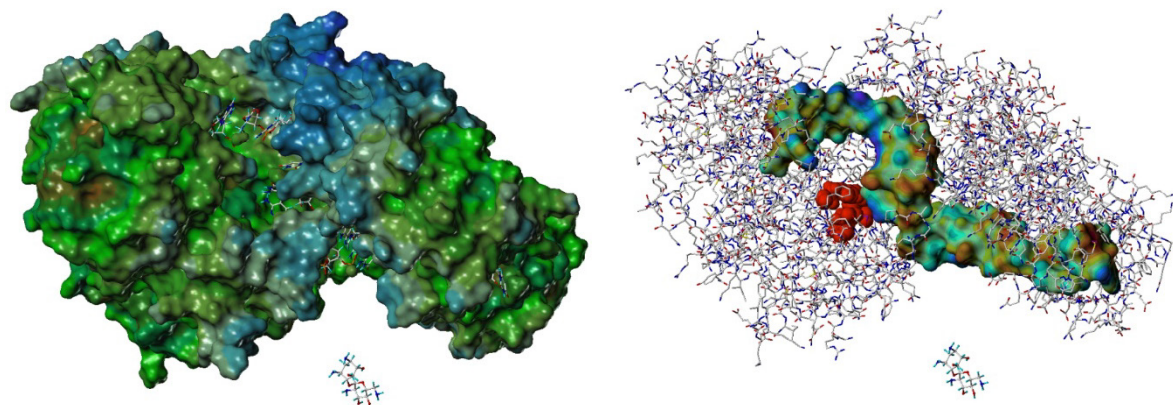


Abb. 4.3.15: Struktur von Ago2 mit einer miRNA im Komplex (PDB: 4Z4D). Die mit SYBYL 7.3 berechnete Connolly-Oberfläche wurde mit dem elektrostatischen Potential codiert, jeweils für das Protein (links) und die miRNA (rechts). rechts, rot markierte Aminosäuren: das aktive Zentrum der Spaltungseigenschaft von Ago2 bestehend aus Asp597, Asp669 und His807. Modifiziert nach 4Z4D ohne Substrat, ohne Kristallwasser oder Liganden, aber mit hinzugefügter niedermolekularer Verbindung (Neamin).

4.3.3 Zusammenfassung und Diskussion zum BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay

Die Identifizierung potentieller Inhibitoren der miRNA-Reifung bzw. der sich anschließenden posttranskriptionellen Regulationsmechanismen wird auf der Ebene der verschiedenen Interventionspunkte für diese Prozesse angestrebt (Abb. 2.2.1). Eine Möglichkeit die posttranskriptionelle Genregulation zu modulieren, befindet sich auf der Ebene der mRNA-Spaltung durch die RISC-Komponente Ago2 unter Beteiligung einer reifen miRNA. Die Entwicklung stabiler Testsysteme, die zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefern, ist eine wichtige Grundlage für die Identifizierung von Inhibitoren (oder Aktivatoren).

Der hier vorgestellte BRCA-basierende Ago2-vermittelte Spaltungsassay stellt eine einfache und zuverlässige Methode dar. Er ermöglicht das Screening potentieller Inhibitoren des Ago2-vermittelten Spaltungsschrittes. Die Anwendung diesbezüglich wurde exemplarisch anhand von sechs Aminoglykosiden, einer häufig verwendeten Substanzklasse zur Untersuchung von RNA-Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen, gezeigt. Durch die Verwendung von 96-Well-qPCR-Platten in einer qPCR-Maschine, konnte die Amplifizierung in Echtzeit detektiert werden. Das Plattenformat ermöglichte die gleichzeitige Untersuchung von mehreren Testsubstanzen.

Eine für den Ago2-Spaltungsschritt bisher häufig verwendete Methode zur Auswertung der Ago2-vermittelten Substratspaltung ist PAGE. Diese Detektionsmethode basiert auf gelelektrophoretischer Trennung der Komponenten zur Unterscheidung von prozessiertem und nichtprozessiertem Substrat. Zur besseren Visualisierung der geringen Spaltungsmengen wird dabei häufig ein radioaktiv oder fluorogen gelabeltes Substrat verwendet. Einige Aspekte zeigen jedoch die Grenzen der PAGE-Methode als Detektionsmöglichkeit auf. PAGE eignet sich besonders für Untersuchung einer sehr geringen Probenzahl, für die mit mäßigem Aufwand eine qualitative Aussage getroffen werden kann. Eine quantitative Untersuchung ist hingegen mit einem weitaus größeren Aufwand verbunden, beispielsweise

müssten verschiedene Probenmengen aufgetragen werden oder ein geeigneter Standard etabliert werden. Ebenso ist die Bestimmung von IC50-Werten von Testsubstanzen aufwendig und kann je nach Visualisierbarkeit der Banden für fluorogen gelabelte Substrate sehr ungenau sein.

Ein weiterer Vorteil des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays besteht darin, dass im Gegensatz zur Detektion via PAGE keine gelabelten Substrate verwendet werden müssen. Dies hat zum einen Vorteile bei der Synthese, da sowohl die enzymatische als auch die chemische Synthese von ungelabelter RNA effektiver und kostengünstiger durchgeführt werden kann. Zum anderen besteht im Vergleich zu ungelabelten Substraten die Möglichkeit, dass Fluorophor-gelabelte Substrate die Enzymreaktion bzw. die Untersuchung von Testsubstanzen aufgrund abweichender elektronischer oder sterischer Wechselwirkungen beeinflussen können. Der hier vorgestellte Assay bietet sich ebenso als Alternative zu Methoden mit radioaktiv markierten Substraten an, deren Vermeidung aus Gründen der Praktikabilität und ausschließlicher Einsetzbarkeit innerhalb des Radioaktivlabors von Vorteil ist.

Mit dem hier verwendeten 96-Well-Format können unter Beachtung von Positiv- und Negativkontrollen ungefähr 15 Inhibitoren bzw. 15 Proben gleichzeitig in Dreifachbestimmung getestet werden. Wendet man den Assay als Screening-Methode an, bei der zunächst nur auf aktive Testsubstanzen gescreent wird, also ohne den oben erwähnten individuellen Normalisierungswert, können mindestens 30 Proben gleichzeitig und in Dreifachbestimmung untersucht werden. Statt des individuellen Normalisierungswertes würde die Positivkontrolle ohne Testsubstanz als allgemeiner Normalisierungswert dienen. Entsprechende individuelle Kontrollreaktionen würden dann nachträglich nur mit den positiv getesteten Proben durchgeführt.

Zur Erlangung einer größeren Probenzahl für eine Messung wäre eine Anpassung auf ein 384-Well-Format unter Verwendung des geeigneten Detektionsequipments durchführbar. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, die Probengröße von 20 µl auf beispielsweise 10 µl zu verringern. Dadurch könnte mit gleicher Materialmenge die doppelte Anzahl an Proben bzw. Testsubstanzen untersucht werden. Allerdings ist zu beachten, dass es sich bei dem vorgestellten BRCA-Assay um die kontinuierliche Messung einer Polymerase-Reaktion über ein bis zwei Stunden bei 57 °C handelt. Es ist sicherzustellen, dass die Ansätze während der Messung nicht austrocknen. Aus diesem Grund wäre die Verwendung einer 384-Well-qPCR-Maschine gegenüber eines Platten-Lesegerätes vorzuziehen.

Je nach Anwendungsfeld, kann der BRCA-basierende Ago2-vermittelte Spaltungsassay für eine andere miRNA als die hier verwendete miR-122 angepasst werden. Hierfür ist neben der anderen miRNA, die Herstellung eines geeigneten, komplementären Substrates notwendig. Für den BRCA-Assay muss lediglich das zugehörige zirkuläre DNA-Templat (Padlock) konzipiert und hergestellt werden.

Der BRCA-basierende Ago2-vermittelte Spaltungsassay ermöglicht nicht nur die Verwendung als Screening-Werkzeug. Auch Untersuchungen bezüglich des Wirkmechanismus von Inhibitoren miRNA-involvierter Prozesse, die z. B. aus zellbasierenden Untersuchungen stammen, könnten durchgeführt werden. Damit kann beispielsweise getestet werden, ob der Ago2-vermittelte Spaltungsschritt für einen gegebenen Inhibitor den relevanten Reaktionsschritt darstellt.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass der hier etablierte Assay zur Identifizierung und Untersuchung niedermolekularer Verbindungen beitragen soll, die ein Schlüsselement in der Manipulation posttranskriptioneller Genregulierung darstellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Nicht-codierende RNAs zeigen sich zunehmend als wesentlicher Bestandteil regulatorischer Prozesse in einer Vielzahl von Organismen, wie auch im menschlichen Organismus. Die Untersuchung der Bedeutung der Gruppe kleiner, nicht-codierender RNAs für posttranskriptionelle Regulationsmechanismen auf Ebene der mRNA ist zu einem wesentlichen Bestandteil der Forschung geworden. Diese kleinen RNAs, zu denen u. a. miRNAs gehören, sind von großer Relevanz in der Erforschung körpereigener Prozesse und der Entstehung von Krankheiten, weshalb sowohl ihre regulierenden wie auch deregulierenden Eigenschaften im Fokus stehen.^[3, 22, 23]

Eine weitere Gruppe stellen die langen, nicht-codierenden RNAs dar, zu denen auch die zirkulären circRNAs gehören. Obwohl sie sich durch ihre Länge, Form und Entstehung grundlegend von miRNAs oder siRNAs unterscheiden, ist ihre biologische Funktion ebenso genregulatorisch.^[5] Im Vergleich zur Gruppe der miRNAs steckt für circRNAs die Erforschung sowohl ihrer Vielfalt als auch ihrer Funktion und Bedeutung in den Anfängen, obgleich ihre fundamentale Entdeckung ähnlich der von miRNAs in den Neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts stattfand.^[35]

Die vorliegende Arbeit bietet unterschiedliche Möglichkeiten zur Untersuchung nicht-codierender RNAs, wobei drei verschiedene Ansätze formuliert wurden: (1) Die Funktionalisierung und Zyklisierung von circRNA zur Identifizierung von Interaktionspartnern und Wirkmechanismen. (2) Die Modifizierung von pre-miRNA mit einem Fluorophor/Quencher-Paar zur Visualisierung und Lokalisierung der miRNA-Reifung *in cellulo*. (3) Die Etablierung eines BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays für *High-Throughput-Screenings* potentieller Inhibitoren *in vitro*.

5.1 Chemo-enzymatische Methoden zur Zyklisierung von RNA

Zur Generierung einer funktionalisierten circRNA wurde in der vorliegenden Arbeit ein Grundkonzept entwickelt, welches eine Kombination aus chemischen und enzymatischen Methoden beinhaltet. Zur Generierung einer solchen circRNA wurde in Anbetracht der beträchtlichen circRNA-Größe von über 200 bp zunächst die Etablierung einer Methode zu ihrer Zyklisierung auf Basis von Click-Chemie angestrebt. Dazu wurde die ca. 450 bp große CRKL-circRNA mit *in-vitro*-Transkription als lineares RNA-Transkript generiert und an den Enden für die Ermöglichung einer Zyklisierung über Kupfer-katalysierte Clickchemie (Click-RNA-Ligation) modifiziert (Abb. 5.1.1).

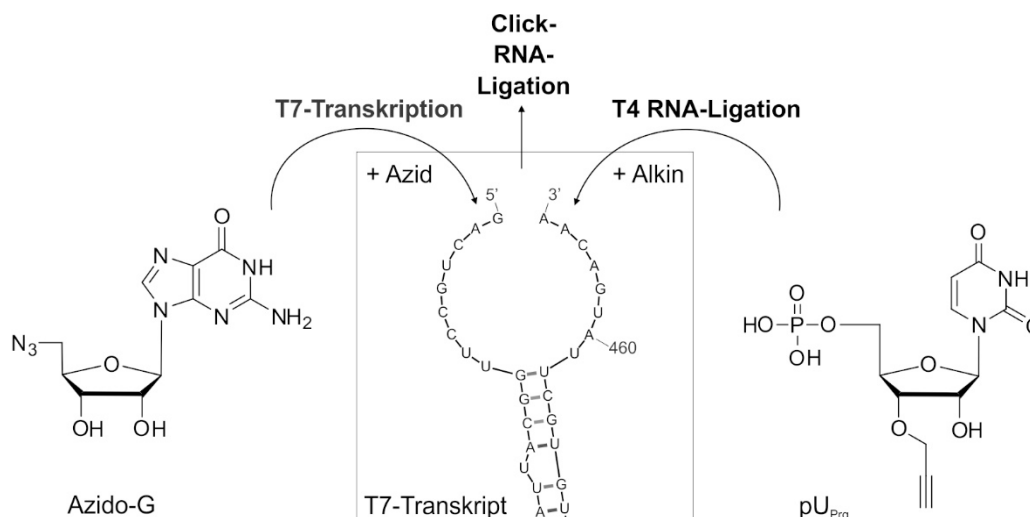


Abb. 5.1.1: Schematische Darstellung der Modifizierung von RNA zur Generierung von circRNA über intramolekulare Click-RNA-Ligation.

Das verwendete CRKL-Templat verfügte über eine Sekundärstruktur mit verschiedenen Strukturbereichen, weshalb das Transkript so gewählt wurde, dass der 3'- und 5'-Terminus die Enden einer offenen Haarnadelstruktur darstellten. Die Einführung der für die gewählte Methode der CuAAC notwendigen Alkin- und Azid-Funktionalität wurde über die Herstellung entsprechend chemisch modifizierter Nukleotid-Bausteine ermöglicht (Abb. 5.1.1). Die Inkorporierung am 5'-Terminus erfolgte dabei während der Transkription mit T7-RNA-Polymerase über einen T7-Starter-Guanosin-Baustein, der eine 5'-Azido-Gruppe enthielt (Azido-G). Der Einbau am 3'-Terminus wurde mit der T4-RNA-Ligase-1 über die enzymatische Ligation eines 3'-Alkin-modifizierten Uridin-Bausteines (pU_{Prg}) realisiert. Analog zu Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Brown an DNA sollte die Zyklisierung über eine nicht-templatgesteuerte, intramolekulare Click-RNA-Ligation erfolgen.^[192, 197] Die durch CuAAC gebildete 3',5'-Verknüpfung sollte dabei eine ausreichende Ähnlichkeit mit einer natürlichen Phosphatbindung aufweisen, um als circRNA-Analogen zu agieren. Für die Funktionalisierungsreaktionen am 5'-Terminus und am 3'-Terminus wie auch für die Zyklisierungsreaktion wurden verschiedene Test-RNA-Transkripte generiert, die eine geringere Länge hatten, um die Handhabung und Analyse in der Testphase zu vereinfachen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Einbau von Azido-G durch *in-vitro*-Transkription möglich war. Der Einbau zeigte eine Abhängigkeit von der verwendeten Transkriptionsmethode und den Transkriptionsbedingungen. Sowohl für die sog. *fed-batch*^[150]- als auch *run-off*-Methode wurden geeignete Reaktionsbedingungen etabliert. Der Anteil Azido-G-inkorporierter RNA konnte durch die Verwendung nur geringer Mengen an DNA-Templat erhöht werden, jedoch wurde im Vergleich zur Standardtranskription ohne Azido-G eine deutlich minimierte Gesamtausbeute festgestellt. Für die Ligrationsreaktion wurde ein Verfahren nach der Arbeit von Dojahn *et al.*^[150] herangezogen, welches das Alkin-modifizierte Uridin-Bisphosphat pUp^{Alk} verwendete. Die Ligation von pU_{Prg} mit der T4-RNA-Ligase-1 an einen RNA-Akzeptor erfolgte in ähnlicher Ausbeute wie mit dem Vergleichsdonor pUp^{Alk}, wie die PAGE-Analyse bestätigte. Damit

konnte gezeigt werden, dass auch Nukleotide ohne eine 3'-Phosphatgruppe als Donor der T4-Rnl1 fungierten. Ebenso gelang die Ligation des zu pU_{Prg} analogen, aber 2'-OH-defizitären Nukleotides pdU_{Prg}, wodurch verdeutlicht wurde, dass auch an der 2'-Position von Nukleotiden eine Variabilität der Modifizierung für die Verwendung als Donor der T4-Rnl1 bestand. Die Arbeit von Barrio *et al.*^[154] demonstrierte ebenfalls die Ligationsfähigkeit eines 2'-Desoxy-Nukleosids, jedoch mit 3',5'-Bisphosphatgruppen (pdCp) in der Ligation mit der T4-Rnl1 an einen RNA-Akzeptor ohne Minimierung der Ausbeute. Entsprechend dieser Ergebnisse konnte in der vorliegenden Arbeit zwar der erfolgreiche Einbau von pdU_{Prg} beobachtet werden, der die Unabhängigkeit der generellen Ligationsfähigkeit von der 2'-OH-Gruppe demonstrierte, wobei die Ligationsausbeute im Vergleich zur Ligation mit pU_{Prg} geringer war.

Für die Untersuchung der Zyklisierung mit der Click-RNA-Ligation wurden drei offene Haarnadelstrukturen generiert, die sich durch ihre Größe in der offenen Ringstruktur unterschieden, um eine Tendenz zu einer bevorzugten Haarnadelgröße für die angestrebte Zyklisierung anzuzeigen (Abb. 4.1.13). Eine Auswertung der Zyklisierungsreaktion mit denaturierender PAGE war möglich, da zyklisierte RNA eine geringere Gel-Mobilität besitzt als ihr lineares Pendant.^[197] Die Gel-Analyse der Ansätze nach der Clickreaktion ergab jedoch, dass keine Zyklisierung beobachtet werden konnte (Abb. 4.1.16). Als Ursache wurde die Ausführung der Reaktion mit einem Produktgemisch, welches zu wenig zyklisierungsfähige RNA enthielt, in Betracht gezogen. Dieses Produktgemisch konnte sowohl das gewünschte, zweifach terminal modifizierte Zielmolekül als auch einfach 5'- oder 3'-modifizierte RNA beinhalten. Wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, wurde der Anteil 3'-ligierter RNA nach T4-RNA-Ligation in verschiedenen Arbeiten mit unterschiedlichen Ausbeuten bewertet. Neben einer Abhängigkeit von Akzeptor-RNA und Donor-Nukleotid wurde auch eine unterschiedliche Ligationsfähigkeit von Nukleotiden mit verschiedenen Funktionalisierungen festgestellt.^[151, 154, 155, 195]

Weiterführende Untersuchungen zur Zyklisierungsreaktion über Click-RNA-Ligation sollten auf Grundlage der hier gezeigten qualitativen Aussagen zusätzlich eine quantitative Analyse beinhalten. Dies ermöglicht eine individuelle Bewertung des Einbaus bei der Transkription und der Ligationsfähigkeit für jeden Nukleotid-Baustein in entsprechender Abhängigkeit des verwendeten DNA-Templates bzw. RNA-Akzeptors. Eine Quantifizierung ist beispielsweise durch die Modifizierung der Alkin-Einheit oder Azid-Einheit mit Biotin möglich, welches für eine Separierung und Quantifizierung über Streptavidin-beschichtete Beads genutzt werden kann. Biotin ermöglicht ebenfalls die PAGE-Analyse über den Biotin-EMSA. Für die Analyse ist eine differenzierte Betrachtung der Ligrationsreaktion am 3'-Terminus von bereits 5'-Azido-modifizierter RNA im Vergleich zu nicht-5'-modifizierter RNA in Betracht zu ziehen. Diese Methoden stellen reine Quantifizierungsmöglichkeiten dar, aber keine zur Reinigung der gesuchten RNA-Produkte mit ihren Azid- und Alkin-Einheiten. Eine Möglichkeit der Abtrennung von nicht 3'-modifizierter RNA nach Ligation, ohne die Funktionalisierung der 3'-modifizierten RNA zu verlieren, besteht in der chemischen Veränderung der nichtligierten RNA, welche die Modifizierung zu einer abtrennbaren RNA zuließe. Eine häufig

verwendete Methode ist die Periodatoxidation, die nur am 3'-Terminus von RNA mit 2',3'-Diolen vonstattengeht.^[144, 157] Eine Folgereaktion über Aldehyd-Hydrazin-Chemie ermöglicht beispielsweise die Einführung einer Biotingruppe und die Abtrennung der Biotin-gelabelten RNA.^[147, 198] Diese Methode kann ebenfalls nach einer Zyklisierungsreaktion für die Trennung von 3'-unmodifizierter RNA vom Zyklisierungsprodukt in Betracht gezogen werden.

Weiterführende Arbeiten könnten die Funktionalisierung entsprechend dem erläuterten Grundkonzept zur Herstellung einer funktionalisierten circRNA anstreben. Eine generelle Vorgehensweise ist zum einen der ortsspezifische Einbau von genau einer Funktionalisierung je RNA-Molekül oder zum anderen der unspezifische Einbau. Der unspezifische Einbau könnte mit der *in-vitro*-Transkription erfolgen, indem funktionalisierte Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs) dem Transkriptionsgemisch beigelegt und anteilig zu unveränderten rNTPs eingebaut würden. Eine spezifische Funktionalisierung könnte durch den Einbau eines zweifach funktionalisierten Donor-Nukleotides während der T4-RNA-Ligation realisiert werden. Dabei würde der Baustein pU_{prg} zusätzlich an der Nukleobase mit einer zweiten Funktionalisierung modifiziert werden und trotzdem der Zyklisierung zur Verfügung stehen. Diese zusätzliche Funktionalisierung könnte über einen Linker mit geeigneter Länge zur Nukleobase gebunden sein, um weiterhin eine Ligations- und Zyklisierungsfähigkeit zu gewährleisten. Spezifische sowie unspezifische Modifizierungen besitzen unterschiedliche Vorteile: Ein Vorteil der unspezifischen Modifizierung mit statistischer Verteilung über das RNA-Molekül ist, dass bindungsrelevante Positionen nicht vollständig durch eine spezifische Modifizierung überdeckt werden. Eine spezifische Modifizierung ist dem gegenüber an einer definierten und bekannten Position vorhanden, deren Vorhandensein in der Planung und Entwicklung von Testsystemen beachtet werden kann.

5.2 Synthese von mono und dual gelabelten pre-miRNA-Sonden zur Lokalisierung der miRNA-Reifung *in cellulo*

Für die Untersuchung der Lokalisierung von pre-miRNA und ihrer Reifung in Nervenzellen wurden zwei gelabelte pre-miRNA-Sonden hergestellt. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie sollte untersucht werden, ob eine lokale Prozessierung von pre-miR-134 zu reifer miRNA in den Dendriten von Nervenzellen erfolgte. Dafür wurden eine einfach Cy3-gelabelte und eine dual gelabelte, gequenchete Dabcyl/Alexa633-Sonde der pre-miR-134 hergestellt (Abb. 5.2.1), indem eine Kombination aus enzymatischen und chemischen Methoden verwendet wurde. Ähnlich den Experimenten zur Herstellung von circRNA umfassten diese T7-Transkription, T4-RNA-Ligation und Click-Chemie unter Verwendung chemisch modifizierter Nukleotid-Bausteine.

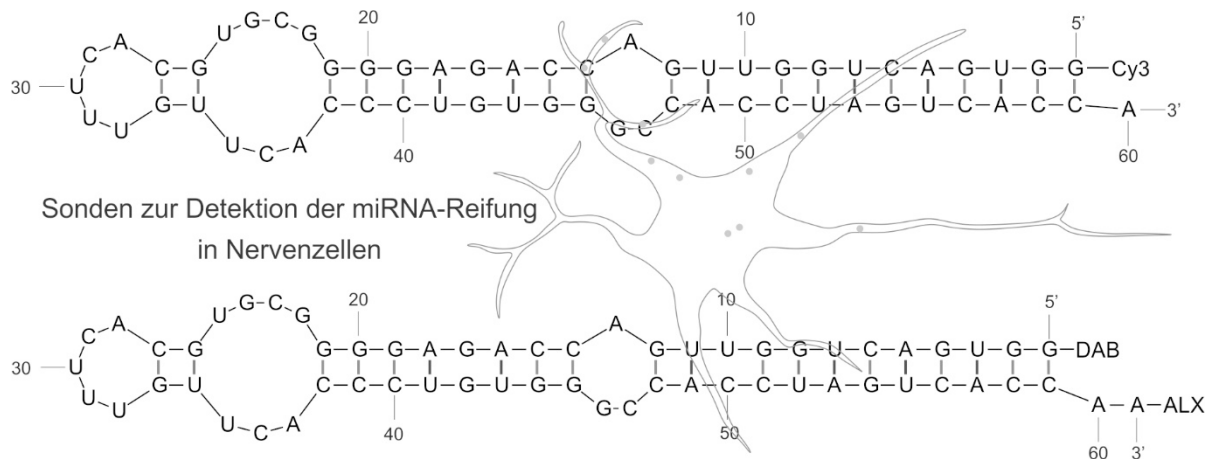


Abb. 5.2.1: Schematische Darstellung der gelabelten pre-miR-134-Sonden zur Detektion und Lokalisierung der miRNA-Reifung in der Nervenzelle. Sequenzinformationen von *miRBase*^[204], modifiziert für *in-vitro*-Transkription. Die Sekundärstrukturen wurden ohne die Modifizierungen mit dem *RNA Folding Form* von *The mfold Web Server* berechnet.^[191] ALX: Alexa633. DAB: Dabcyl.

Es wurde die Transfektion der mono-5'-gelabelten und der dual-3',5'-gelabelten Sonde der pre-miR-134 in neuronale Primärzellen demonstriert. Fluoreszenz-Aufnahmen der genannten Sonde, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schratt angefertigt wurden, zeigten, dass eine Transfektion erfolgreich war und die Sonden in den Neuronen lokalisiert waren (Abb. 4.2.5, Abb. 5.2.2, B). Das Prinzip der Lokalisierung des Ortes der miRNA-Reifung innerhalb der Zelle beruht auf der Dicerspaltung der Sonde und gleichzeitiger Aufhebung des quenchenden Effektes der Dabcyl/Alexa633-Sonde, wodurch eine Zunahme des Fluoreszenzsignals zu erwarten war, wie *in vitro* gezeigt wurde (vgl. Abb. 5.2.2, A). Die einfach gelabelte Cy3-Sonde wurde als Testsonde zur Etablierung der Transfektionsbedingungen und zudem als Vergleichssonde zu den Beobachtungen mit der dual gelabelten Sonde eingesetzt. Für die dual gelabelte Sonde konnten erste Voruntersuchungen zur Detektion der miRNA-Reifung durchgeführt werden. Bei der Mikroskopaufnahme 2 h nach der Transfektion wurde ein Alexa633-Fluoreszenzsignal sowohl im Zellkörper als auch vereinzelt in den Dendriten lokalisiert (Abb. 5.2.2, B, Pfeile). Dies stand in Konformität mit Untersuchungen zur Dicer-vermittelten Spaltung an verschiedenen pre-miRNAs, die *in vitro* durchgeführt wurden und einen Substratumsatz von mindestens 60 % nach einer Inkubationszeit von 2 h feststellten.^[52] Unter der Annahme, dass es sich bei dem Alexa633-Fluoreszenzsignal um prozessierte pre-miRNA handelte, wurden erste Hinweise auf eine Prozessierung der Sonde im Zellkörper und auch in den Dendriten gefunden. Basierend auf diesen Ergebnissen können weiterführende Untersuchungen zur zeitabhängigen Entwicklung des Fluoreszenzsignals in den Zellen durchgeführt werden. Dafür sind beispielsweise Fluoreszenzaufnahmen in kurzen Zeitabständen ab dem Transfektionszeitpunkt geeignet, die mit konfokaler Mikroskopie an lebenden Zellen gemacht werden. Alternativ ist auch eine Dokumentation durch die Zellfixierung in kurzen Intervallen ab der Transfektion und anschließender mikroskopischer Auswertung möglich.

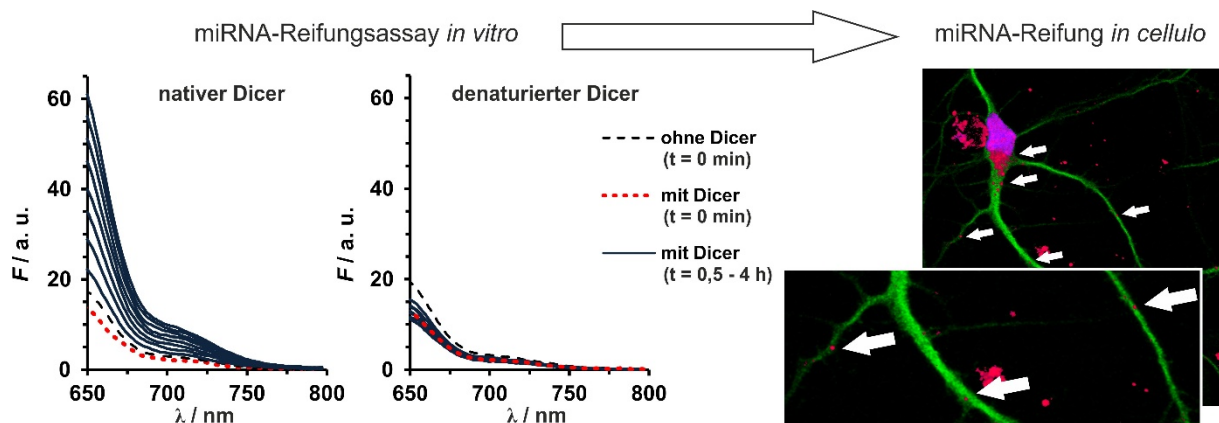


Abb. 5.2.2: Verwendung einer dual gelabelten, gequenchten Alexa633/Dabcyl-Sonde der pre-miR-134 zur Detektion und Lokalisierung der miRNA-Reifung *in cellulo*. links: Fluoreszenzsignal bei Spaltung der dual gelabelten Dab-pre-134-Ax633 durch rhDicer *in vitro*. rechts: Konfokale Mikroskop-Aufnahme einer mit Dab-pre-134-Ax633 transfizierten, neuronalen Primärzelle. rot: Alexa633. blau: Hoechst. grün: MAP2. F: Fluoreszenz. rechts unten: vergrößerter Ausschnitt der Mikroskop-Aufnahme.

5.3 BRCA-basierender Ago2-vermittelter Spaltungs-Assay

Der Ago2-vermittelte Spaltungsschritt ist ein posttranskriptioneller Regulationsmechanismus, der sich an die miRNA-Reifung anschließt. Er stellt einen möglichen Interventionspunkt dar, an dem die miRNA-basierende Transkriptionskontrolle durch die Verwendung von Inhibitoren oder Aktivatoren dieses Spaltungsschrittes beeinflusst werden kann. Die Simulation des Ago2-vermittelten Spaltungsschrittes ist *in vitro* über den Einsatz eines sog. minimalen RISC möglich, der aus dem rekombinanten, humanen Ago2 (rhAgo2) und einer reifen, einzelsträngigen miRNA besteht und ein RNA-Substrat komplementär binden und spalten kann.^[107, 205] In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der *branched rolling-circle amplification* (BRCA)^[87, 89] zur Etablierung einer einfachen, zuverlässigen und vielseitig anwendbaren Detektionsmethode des Ago2-vermittelten Spaltungsschrittes verwendet (Abb. 5.3.1). Entgegen der für die Beobachtung des Ago2-Spaltproduktes häufig angewendeten Detektionsmethode der PAGE-Analyse ermöglichte der BRCA-basierende Detektionsschritt die gleichzeitige Untersuchung einer größeren Probenzahl mit geringem Aufwand und ohne Verwendung von radioaktiv oder fluorogen gelabeltem Substrat.^[74, 107, 205]

Das hier verwendete zweistufige Modell bestand aus dem Ago2-vermittelten Spaltungsschritt und dem BRCA-basierenden Detektionsschritt. Im Spaltungsschritt wurde ein mRNA-ähnliches Substrat von einem minimal RISC gespalten, welcher aus rhAgo2 und einzelsträngiger, reifer miRNA miR-122 bestand. Das im Spaltungsschritt entstandene, neue 3'-Ende des gespaltenen Substrates diente im nachfolgenden Detektionsschritt als Primer bzw. Initiator der BRCA-Reaktion. Nichtgeschnittenes mRNA-ähnliches Substrat fungierte nicht als Primer, da dessen 3'-Ende nicht komplementär zum zirkulären BRCA-Templat war und die verwendete Polymerase (*Large Fragment Bst DNA Polymerase*) keine Exonuklease-Aktivität besaß (Abb. 5.3.1). Die Detektion des Amplikons erfolgte während der Amplifizierung durch Verwendung von *SYBR Gold* anhand des ansteigenden Fluoreszenzsignals.

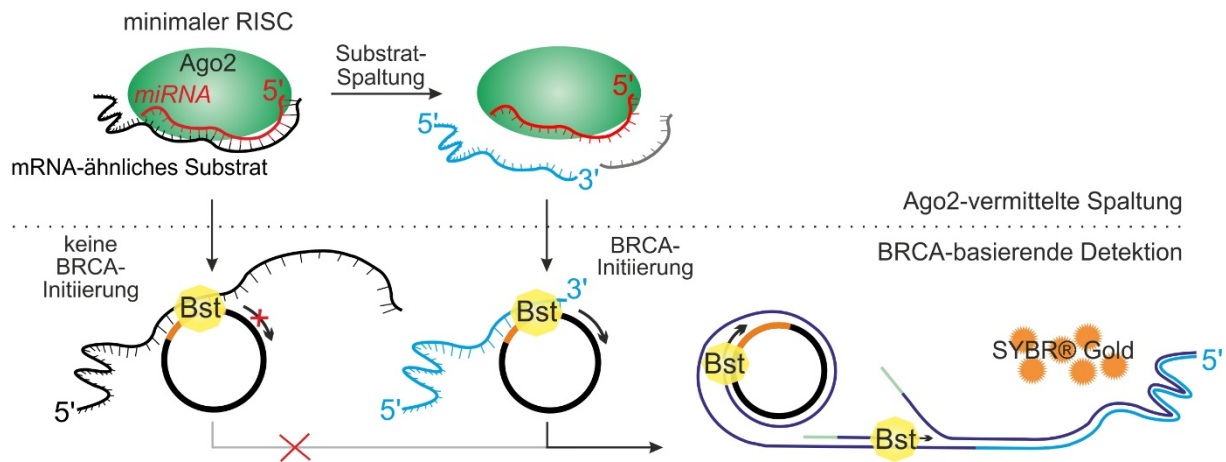


Abb. 5.3.1: Schematische Darstellung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays. Der obere Teil repräsentiert den ersten Schritt, in welchem die Spaltung von einem RNA-Substrat und die Testung potentieller Inhibitoren stattfinden. Der untere Teil zeigt den Detektions-Schritt, in welchem ein Fluoreszenzanstieg beobachtet werden kann, wenn gespaltenes Substrat vorhanden ist (BRCA-Initiierung). Bst: Bst DNA-Polymerase (*Large Fragment*). BRCA: *branched rolling-circle amplification*. Ago2: Argonaut 2.

Die Untersuchung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays zeigte eine Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Inkubationszeit im Spaltungsschritt (Abb. 5.3.2, A). Die PAGE-Auswertung der BRCA-Ansätze nach dem Detektionsschritt verdeutlichte dies durch eine Zunahme der Intensität der Amplikon-Banden mit längerer Ago2-Inkubationszeit (Abb. 5.3.2, A). Eine Zunahme des Fluoreszenzanstieges wurde über eine Ago2-Inkubationszeit von 360 min beobachtet.

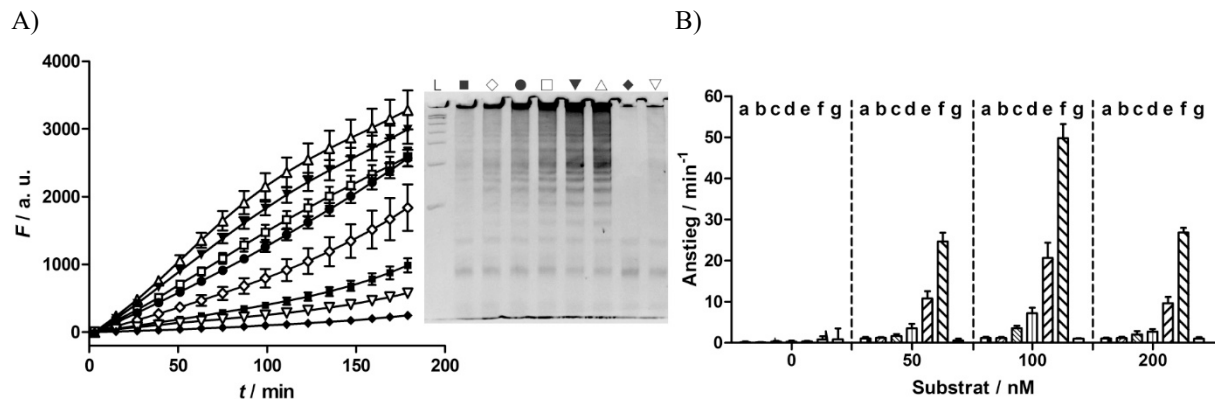


Abb. 5.3.2: Etablierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays. A) Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals im BRCA-Detektionsschritt von der Ago2-Inkubationszeit im Spaltungsschritt und denaturierendes PA-Gel mit den Detektionsansätzen nach der Detektion. Inkubationszeiten: (■) 1 min, (◇) 10 min, (●) 30 min, (□) 60 min, (▼) 90 min, und (△) 120 min. Kontrollen zeigen den Anstieg nach Inkubation ohne miR-122 über (◆) 60 min und (▽) 120 min. L: 0,1-1 kb RNA-Leiter (*RiboRuler*). Mittelwerte \pm SD B) Fluoreszenzanstieg unter Verwendung verschiedener Substrat- und Ago2-Konzentrationen. rhAgo2-Konzentrationen: (a) 0 nM, (b) 5 nM, (c) 10 nM, (d) 20 nM, (e) 40 nM, (f) 80 nM und (g) 80 nM denaturiertes rhAgo2. Mittelwerte \pm SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat.

Um die optimale Enzymkonzentration in Bezug auf das Detektionssignal zu bestimmen, wurden verschiedene Substrat-Konzentrationen unter Verwendung von unterschiedlichen Mengen rhAgo2

getestet (Abb. 5.3.2, B). Es wurde gezeigt, dass sich mit zunehmender rhAgo2-Konzentration der Fluoreszenzanstieg für jede gewählte Substratkonzentration erhöhte. Zu einer weiteren Demonstration der Abhängigkeit des Assays von der Ago2-Enzymaktivität wurde die höchste verwendete rhAgo2-Konzentration in denaturierter Form eingesetzt. Dabei konnte nur ein geringer Anstieg für die verwendeten Substratkonzentrationen beobachtet werden (Abb. 5.3.2, B).

Um den vorgestellten BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays als Screening-Methode zur Identifizierung potentieller Inhibitoren der mRNA-Spaltung zu etablieren, wurde exemplarisch eine Auswahl an Testsubstanzen aus der Gruppe der Aminoglykoside untersucht. Dabei wurden die sechs Aminoglykoside Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Kanamycin A, Kanamycin B, Neomycin B und Neamin mit jeweils einer Konzentration von 100 μM im Ago2-vermittelten Spaltungsschritt eingesetzt. Eine Auswertung erfolgte über den BRCA-Detektionsschritt durch Messung des Fluoreszenzsignals und die Ermittlung der verbleibenden rhAgo2-Aktivität. Die getesteten Aminoglykoside zeigten ein unterschiedliches Verhalten im Ago2-Assay, wobei Kanamycin B und Neomycin B die rhAgo2-Aktivität signifikant auf ca. 60 % und ca. 30 % minimierten (Abb. 5.3.3, A). Kanamycin A und Neamin verminderten die rhAgo2-Aktivität signifikant auf ca. 80 %. Streptomycin und Dihydrostreptomycin zeigten keine Beeinflussung der Ago2-Aktivität. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass unter einer Gruppe von Testsubstanzen unterscheidbare Wechselwirkungen mit dem Ago2-System auftraten und deren Detektion mit der BRCA möglich war.

Die Betrachtung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen RNA und Aminoglykosiden verdeutlicht ihre Fähigkeiten zur Interaktion. Während bei RNA mit ihrem Phosphatrückgrat die negative Ladung dominiert, zeichnen sich Aminoglykoside durch ihre positive Ladung aus.^[97] In diesem Zusammenhang konnte in verschiedenen Arbeiten eine steigende Affinität der RNA-Bindung mit der Anzahl der Amine der Aminoglykoside beobachtet werden.^[206, 207] Die hier gezeigten Ergebnisse mit den getesteten Aminoglykosiden im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Reifungsassay weisen eine starke Korrelation zwischen der Anzahl der Amine und ihrer Beeinflussung der Ago2-Aktivität auf. Neomycin B mit sechs Aminogruppen beeinflusste die Ago2-Aktivität stärker als Kanamycin B mit fünf Aminogruppen. Entsprechend wurde bei den Substanzen Kanamycin A und Neamin mit jeweils vier Aminogruppen eine geringere Beeinflussung der Ago2-Aktivität festgestellt als bei Kanamycin B. Streptomycin und Dihydrostreptomycin beeinflussten die Ago2-Aktivität mit nur einer Aminogruppe und zwei Guanidinogruppen nicht.

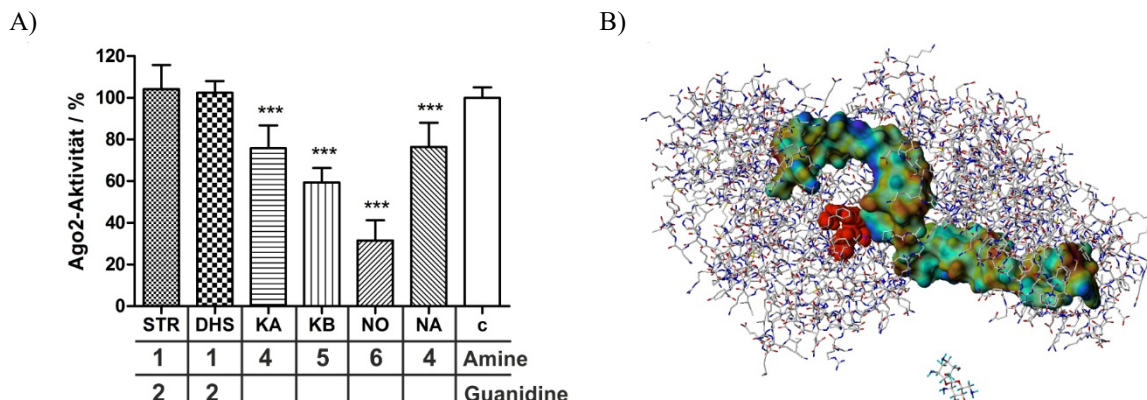


Abb. 5.3.3: Beeinflussung der Ago2-Aktivität unter verschiedenen Aminoglykosiden. A) Ermittlung der Ago2-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Aminoglykosiden (100 μ M) im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay. Mittelwerte + SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikate. Mann-Whitney-U-Test. *** $p < 0,0001$; c vs. KA, KB, NO, NA. STR: Streptomycin, DHS: Dihydrostreptomycin, KA: Kanamycin A, KB: Kanamycin B, NO: Neomycin B, NA: Neamin, c: Kontrolle ohne Testsubstanz. Tabelle: Vergleich der Anzahl der Aminogruppen und Guanidinogruppen. B) Struktur von Ago2 mit einer miRNA im Komplex (PDB: 4Z4D) und Neamin. Die mit SYBYL 7.3 berechnete Connolly-Oberfläche wurde für die miRNA mit dem elektrostatischen Potential codiert. rot: Aminosäuren des aktiven Zentrums.

Die aufgrund der hohen Affinität von Aminoglykosiden an RNA zu erwartende Bindung von mehr als einem Aminoglykosid-Molekül pro RNA-Molekül ließ eine teilweise unspezifische Bindung erwarten.^[97] Diese Vermutung konnte mit dem BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay durch die Ergebnisse der Interaktion im mikromolaren Bereich gestützt werden.^[207, 210] Bei der Betrachtung der Kristallstruktur des Ago2/miR-122-Komplexes zusammen mit einem Neamin-Molekül wurde zudem verdeutlicht, dass ein RNA-affines Aminoglykosid-Molekül auch aufgrund seiner Größe mehrere Bindungsmöglichkeiten am RNA-Molekül eingehen kann. Entsprechend würde nur ein Teil der Bindungsereignisse in Proximität zum aktiven Zentrum (Abb. 5.3.3, B, rot markierter Bereich) stattfinden und durch diese Interaktion zu einer möglichen Minimierung der Ago2-Spaltungsaktivität führen.

Zur Validierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays als Quantifizierungsinstrument wurde eine Kalibrierung mit einem Standard, der dem Substrat-Spaltprodukt entspricht, durchgeführt. Es konnte eine lineare Abhängigkeit des Fluoreszenz-anstieges während der BRCA-Reaktion von der Konzentration des Standards bis zu einem Wert von ca. 20 nM festgestellt werden (Abb. 5.3.4, A). Mittels Standardaddition konnte berechnet werden, dass unter den verwendeten Standardreaktionsbedingungen ca. 6 % Substrat von 100 nM mRNA-ähnlichem Substrat mit 40 nM rhAgo2 innerhalb von 60 min gespalten wurden (Abb. 5.3.4, A, B). Der ermittelte Substratumsatz steht in Konformität mit der Arbeit von Rivas *et al.*^[74], in der ca. 3 % Spaltprodukt unter ähnlichen Reaktionsbedingungen beobachtet wurde. Die hier gezeigte erfolgreiche Etablierung geeigneter Kalibrierkurven mit linearem Bereich mit Standardaddition für geringe Mengen an Spaltprodukt stellt zudem eine geeignete Voraussetzung zur Durchführung kinetischer Untersuchungen mit dem BRCA-Assay im Rahmen der Ago2-vermittelten Substratspaltung dar.

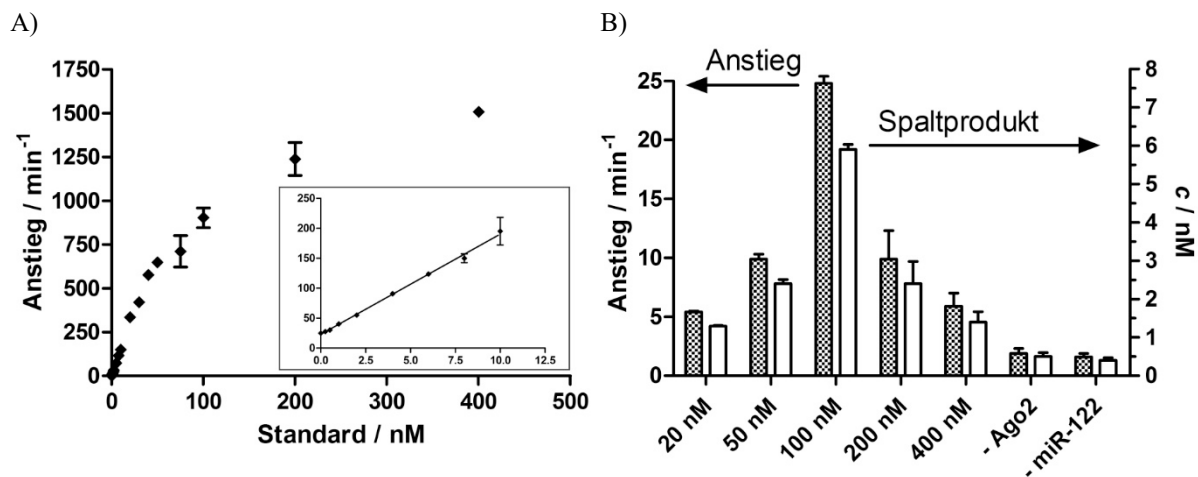


Abb. 5.3.4: Bestimmung der Menge an Spaltprodukt durch Kalibrierung im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay. A) Kalibrierkurve mit 0,5 nM - 400 nM des Standards entsprechend des Spaltproduktes. kleines Bild: Linearer Bereich der Kalibrierkurve nach Standardaddition mit 100 nM Substrat im Ago2-Assay. B) Vergleich des Anstieges im BRCA-Assay bei unterschiedlicher Substratkonzentration mit der Menge an Spaltprodukt. - Ago2: Kontrollreaktion in Abwesenheit von rhAgo2. - miR-122: Kontrollreaktion in Abwesenheit von miR-122. Mittelwerte + SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat.

Es wurde gezeigt, dass der BRCA-basierende Ago2-vermittelte Spaltungsassay eine einfache und zuverlässige Detektionsmethode unter Verwendung von ungelabelter RNA darstellt. Die Anwendung des vorgestellten Spaltungsassays kann zum Screening potentieller Inhibitoren des Ago2-vermittelten Spaltungsschrittes genutzt werden. Die Verwendung von 96-Well-Platten in einer herkömmlichen qPCR-Maschine ermöglicht dabei die Detektion in Echtzeit, während das Plattenformat die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Testsubstanzen erlaubt. Die Untersuchung größerer Probenzahlen kann durch ein Upscaling des Platten-Formates erreicht werden, wobei die Gewährleistung der Detektionstemperatur von 57 °C über einen Zeitraum von ca. zwei Stunden sichergestellt werden sollte. Zur Erweiterung des Anwendungsfeldes besteht ebenso die Möglichkeit der Verwendung eines anderen miRNA/Substrat-Paares als das hier gezeigte Paar mit der miR-122. Neben der Verwendung als Screening-Werkzeug kann der hier vorgestellte Spaltungsassays zudem zur Untersuchung von Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden. Dabei würde beispielsweise überprüft, ob ein bereits identifizierter Inhibitor der posttranskriptionellen Genregulation auf Ebene der Ago2-vermittelten mRNA-Spaltung aktiv ist.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Generelles Vorgehen beim Arbeiten mit RNA

Alle direkten Arbeiten mit RNA wurden unter Verwendung zertifizierter Pyrogen-, DNase- und RNase-freier Plastikmaterialien durchgeführt. Materialien aus Glas oder Metall wurden hitzebehandelt (2 h, 250 °C). Andere Materialien aus Plastik sowie sämtliche Oberflächen des Arbeitsplatzes wurden mit ca. 1%iger Natriumhypochlorit-Lösung (handelsübliches Bleichmittel, verdünnt mit deionisiertem Wasser) behandelt, gefolgt von einem Spülschritt mit Reinstwasser. Es wurden Nitrilhandschuhe benutzt, die vor jedem Gebrauch mit einigen Tropfen einer 1%igen Natriumhypochlorit-Lösung gesäubert und mit handelsüblichen, gebleichten Küchentüchern getrocknet wurden.

Reinstwasser wurde mithilfe der Wasseraufbereitungsanlage Astacus Life Science von *membraPure* (Hennigsdorf) gewonnen und zum Spülen sowie für die Herstellung von PAGE- und HPLC-Puffern verwendet. Für kleinere Volumina wurde das *Nuclease-free water* der Firma *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, USA) verwendet. PAGE- und HPLC-Puffer wurden mithilfe von 0,45 µm Nalgene® Rapid-Flow™ Bottle Top Filters (PES-Membran, steril, *Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) filtriert. Puffer in kleineren Volumina wurden über 0,45 µm Spritzenfilter von *Whatman* (Dassel) steril filtriert.

6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Verwendete Chemikalien wurden bei *Carl Roth* (Karlsruhe), *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen) bzw. *Acros* (Geel, Belgien) erworben. Sämtliche Verbrauchsmaterialien aus Plastik wurden von *Starlab* (Hamburg), *Sarstedt* (Nümbrecht), *Carl Roth* und *Biozym* (Hessisch Oldendorf) bezogen. Farblose, semi-skirted, 96-Well PCR-Platten und PCR-8er-Streifen wurden bei *Peqlab* (Erlangen) erworben. NAP-5®-Säulen (#17-0853-02) für die Größenausschluss-Chromatografie wurden von *VWR* (Radnor, PA, USA) bezogen, Amicon® Ultra-0.5 ml Zentrifugenfilter, 3 K und 10 K von *Merck Millipore* (Billerica, MA, USA) und SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain von *Invitrogen* (Carlsbad, CA, USA). Das PCR-Aufarbeitungs-Kit MinElute PCR Purification Kit wurde bei *Qiagen* (Hilden) erworben.

6.3 Lösungen und Puffer

1x Ago2-Reaktionspuffer	30 mM Tris pH 7,5 (25 °C); 130 mM KCl; 1,1 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA
Dicer-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 6,8); 12,5 mM NaCl; 2,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT

Natriumacetat-Puffer	3 M NaOAc; pH 5,2
1x PUS-Puffer	0,1 M Tris-HCl pH 8,0 (25 °C), 1 mM MgCl ₂ , 0,1 M NH ₄ OAc
1x T7-Reaktionspuffer	40 mM Tris pH 8,1 (37 °C); 1 mM Spermidin; 22 mM MgCl ₂ ; 0,01 % Triton-X-100; 10 mM DTT; 0,01 mg/ml BSA
Roti®-PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1); äquibriert in TE- Puffer; pH 7,5 - 8,0
0,5 x TBE (Tris/Borat/EDTA)	45 mM Tris-borate; 1 mM EDTA, pH 8,3
TEAA-Puffer	0,1 M Triethylammoniumacetat, pH 7,0
Denat. Urea-Puffer	8 M Harnstoff; 0,5 x TBE
20 % Denat. PA-Gel-Lösung	20 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1); 8 M Harnstoff; 0,5 x TBE
FLB (<i>Formamide Loading Buffer</i>)	90 % Formamid; 18 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau

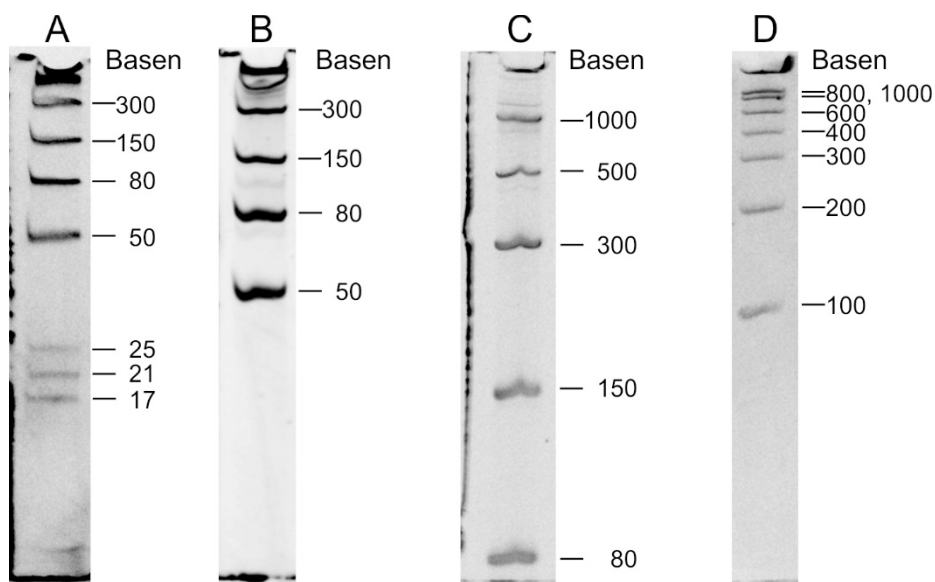
Weitere Enzympuffer wurden zusammen mit dem jeweiligen Enzym bezogen:

1x <i>T4 PNK Reaction Buffer</i>	70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, pH 7,6 (25°C)
1x <i>NEBuffer 3</i>	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9 (25°C)
1x <i>T4 RNA Ligase Reaction Buffer</i>	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; pH 7,5 (25°C)
1x <i>ThermoPol® Reaction Buffer</i>	20 mM Tris-HCl; 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 10 mM KCl; 2 mM MgSO ₄ ; 0,1 % Triton® X-100; pH 8,8 (25°C)

6.4 Enzyme, Kits und DNA/RNA-Marker

Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP; #M0290)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
Bst DNA Polymerase, Large Fragment (#M0275)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
CircLigase™ ssDNA Ligase (#CL4111K)	<i>Epicentre</i> , Madison, WI, USA
Deoxynucleotide Solution Mix, dNTPs (#N0447)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
DNase I, RNase-free (#EN0521)	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, MA, USA
DNase I, RNase-free (#M0303)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
Low Molecular Weight DNA Ladder (25-766 bp; #N3233)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
Low Range ssRNA Ladder (0,05-1 kb; #N0364)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
miRNA Marker (17, 21, 25 nt; #N2102)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
NTP Set (#R0481)	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, MA, USA
Phusion® High-Fidelity PCR Kit (#E0553)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
Pyrophosphatase, Inorganic (from yeast; #EF0221)	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, MA, USA
Recombinant human Ago2 (#11079-H078)	<i>Sino Biological Inc.</i> , Beijing, China

Recombinant Human Dicer Enzyme Kit (#T510002; #T510008)	Genlantis, San Diego, CA, USA
RiboLock™ RNase Inhibitor (#EO0381)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (#P1300)	Promega, Madison, WI, USA
Ribonuclease R, E. coli (#RNR07250)	Epicentre, Madison, WI, USA
RiboRuler Low Range RNA Ladder (0,1-1 kb; #SM1831)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
T4 Polynucleotide Kinase (#M0201)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase; #M0204)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (#K0441)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA



- A ss/miRNA-Leiter: Low Range ssRNA Ladder + miRNA Marker
 B ssRNA-Leiter: Low Range ssRNA Ladder
 C ssRNA-Leiter: Low Range ssRNA Ladder (längere Gel-Laufzeit)
 D RiboRuler Low Range RNA Ladder

6.5 Template, Oligonukleotide, RNA-Bausteine

DNA-Template und andere DNA-Oligonukleotide wurden von *Biotez* (Berlin) erworben. RNA-Oligomere stammen von *Microsynth* (Balgach, Schweiz).

Name	Sequenz	Basen
CRKLsh DNA-Templat	TTGTCATAAGCACAGGGTACATACCTCTAATGCCAAGGCA GTCTATAGTGAGTCGTATTA	60
CRKLsh RNA	GACUGCCUUGGCAUUAGAGGUAUGUACCCUGUGCUUUAU GACAA	43
pre-miR-21 DNA-Templat	AAGGCCCATCGACTGGTGTGTCATGAGATTCAACAGTCA ACATCAGTCTGATAAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA	76
pre-miR-21 RNA	GGGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGG CAACACCAGUCGAUGGGCCUU	59
pre-miR-21c1 DNA-Templat	TTCCTTCATCGACTGGTGTGTCATGAGATTCAACAGTCA ACATCAGTCTGATAAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA	76
pre-miR-21c1 RNA	GGGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGG CAACACCAGUCGAUGAAGGAA	59
Name	Sequenz	Basen
pre-miR-21c2 DNA-Templat	TTCGTTGATCGACTGGTGTGTCATGAGATTCAACAGTCA ACATCAGTCTGATAAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA	76
pre-miR-21c2 RNA	GGGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGG CAACACCAGUCGAUCAACGAA	59
30-mer aus pre-miR-21 DNA-Templat	TTCAACAGTCAACATCAGTCTGATAAGCCCTATAGTGAGT CGTATTA	47
30-mer aus pre-miR-21	GGGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAA	30
pre-miR-134 _{short} DNA-Templat	GTGGCCCACAGGGTGAACAAAGTGCACGCCCTCTGGTC AACCAGTCACCTATAGTGAGTCGTATTA	67
pre-miR-134 _{short}	GGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCGUGCACUUUGUUCAC CCUGUGGGCCAC	50
11nt-RNA-Alexa633	P-CUAGUCACCAA-Alexa633	11
pre-miR-134-A DNA-Templat	TGGTGACTAGGTGGCCCACAGGGTGAACAAAGTGCACGC CCCTCTGGTCAACCAGTCACCTATAGTGAGTCGTATTA	77
pre-miR-134-A, pre-miR-134	GGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCGUGCACUUUGUUCAC CCUGUGGGCCACCUAGUCACCA	60
miR-122	pUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	22
Kalibrier-Standard (geschnittenes Substrat)	GGCUGCGAUGCAAACACCAUUG	22
DNA-Templat mRNA-ähnliches Substrat	TATATTTTTTTAGGTGACTAGGGAGTGTGACAATGGTGTT TGCATCGCAGCCTATAGTGAGTCGTATTA	69
Ago2/miR-122-Padlock	GCGTTAAGACAACAGCAATGGTGTGTTTGCATCGCAGCCAA CGTAGACTCAAATGCCAAATCGTAAA	65

Ago2/miR-122-Sekundärprimer	CCAACGTAGACTCAAATGCC	20
T7-Primer	GGTAATACGACTCACTATAG	20
RNA-Templat für mRNA-ähnliches Substrat	CUGCGAUGCAAACACCAUUGUCACACUCC	29
mRNA-ähnliches Substrat-Alexa633	CUGCGAUGCAAACACCAUUGUCACACUCCCUAGUCACCA A – Alexa633	40
mRNA-ähnliches Substrat-pUp-Cy3	CUGCGAUGCAAACACCAUUGUCACACUCCU – Cy3	30
mRNA-ähnliches Substrat	GGCUGCGAUGCAAACACCAUUGUCACACUCCCUAGUCA CCUAAAAAAAAUAUA	52

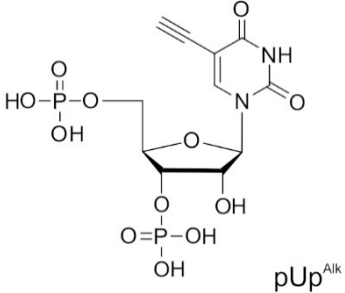
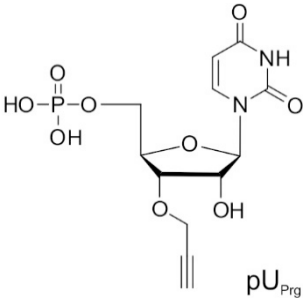
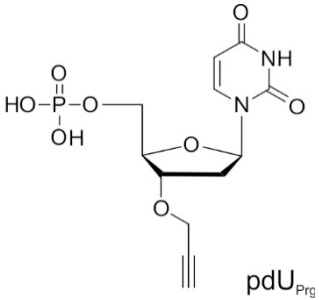
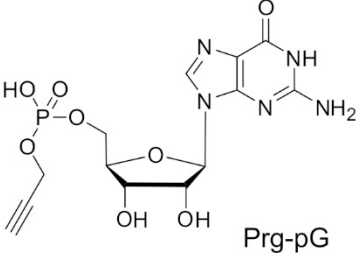
Das Plasmid für die *in-house*-T7-RNA-Polymerase wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Andres Jäschke zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten zur Expression in *E. coli* und die FPLC-Reinigung dieser Polymerase wurden von Stephanie Diederich (Technische Assistentin im Arbeitskreis Arenz) durchgeführt.

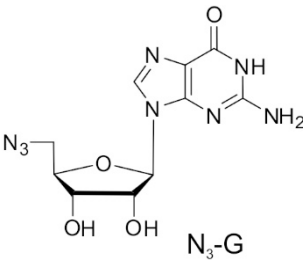
Das Plasmid TOPO6.9 mit der CRKL-Sequenz (geklont in das Plasmid pCR4 TOPO) für die T7-Transkription inkl. PCR-Primer wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Nikolaus Rajewsky zur Verfügung gestellt:

Name	Sequenz	Basen
Primer CRKL fw	gaaattaatacgaactcactatagactgccttggcattagagGTATCCAAGCCCACC AATG	60
Primer CRKL rv	TTGTCATAAGCACAGGGTACTCT	23
CRKL dsDNA-Templat nach PCR	<u>gaaattaatacgaactcactatagactgccttggcattagagGTATCCAAGCCCACC</u> <u>AATGGAAATTAATACGACTCACTATAGACTGCCTTGGCAT</u> TAGAGGTATCCAAGCCCACCAATGGGATCTGTCTCAGCAC CCAACCTGCCTACAGCAGAAGATAACCTGGAATATGTAC GGACTCTGTATGATTTTCCTGGGAATGATGCCGAAGACCT GCCCTTTAAAAAGGGTGAGATCCTAGTGATAATAGAGAA GCCTGAAGAACAGTGGTGGAGTGCCCGGAACAAGGATGG CCGGGTGGGATGATTCCCTGTCCCTTATGTCGAAAAGCTT GTGAGATCCTCACCACACGGAAGCATGGAAATAGGAAT TCCAACAGTTATGGGATCCCAGAACCTGCTCATGCATACG CTCAACCTCAGACCACAACCTCCTCTACCTGCAGTTTCCGG TTCTCCTGGGGCAGCAATCACCCCTTTGCCATCCACACAG AATGGACCTGTCTTTGCGAAAGCAATCCAGAAAAGAGTA CCCTGTGCTTATGACAA	488
CRKL RNA	GACUGCCUUGGCAUUAAGAGGUAUCCAAGCCCACCAAUG GGAUCUGUCUCAGCACCCAACCUGCCUACAGCAGAAGA UAACCUGGAAUAUGUACGACUCUGUAUGAUUUUCCUG GGAAUGAUGCCGAAGACCUGCCCUUAAAAAGGGUGAG AUCCUAGUGAUAAUAGAGAAGCCUGAAGAACAGUGGUG GAGUGCCCGGAACAAGGAUGGCCGGGUUGGGAUGAUUC CUGUCCCUUAUGUCGAAAAGCUUGUGAGAUCCUCACCA CACGGAAAGCAUGGAAAUAGGAAUCCAACAGUUAUGG GAUCCAGAACCCUGCUCAUGCAUACGCUCAACCUCAGAC	466

	CACAACUCCUCUACCUGCAGUUUCCGGUUCUCCUGGGGC AGCAAUCACCCCUUUGCCAUCCACACAGAAUGGACCUG UCUUUGCGAAAGCAAUCCAGAAAAGAGUACCCUGUGCU UAUGACAA	
--	---	--

Die Nukleotidbausteine wurden von Dr. C. M. Dojahn (pUp^{Alk}, Prg-pG), Dipl.-Chem. A. Klose-Stier (N₃-G), M. Sc. R. Harmel (pdU_{Prg}) und Dipl.-Chem. C. Kimmich (pU_{Prg}) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Struktur	Name	Abkürzung
 <p>pUp^{Alk}</p>	3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethynyluridin	pUp ^{Alk}
 <p>pU_{Prg}</p>	5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin Verunreinigungen ca. 50 % (Schätzwert)	pU _{Prg}
 <p>pdU_{Prg}</p>	2'-Desoxy-5'-O-Phosphat-3'-O-Propargyluridin Verunreinigung: NEt ₃ ·HCl ca. 18,6 m%	pdU _{Prg}
 <p>Prg-pG</p>	O-(5'-Guanosin)-O-propargylmonophosphat	Prg-pG

	<p>5'-Azido-5'-Deoxyguanosin</p> <p>Reinheit > 99 %</p>	<p>N₃-G, Azido-G</p>
---	--	-------------------------------------

6.6 Messgeräte

Fluoreszenzspektroskopie: Fluoreszenzspektren für den fluoreszenzbasierenden miRNA-Reifungsassay wurden an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (*Varian*, Palo Alto, CA USA) mit 3 × 3 mm Ultra-Mikro-Küvetten aufgenommen. Schlitzbreite: 10 mm.

Konzentrationsbestimmung mit UV/VIS-Spektrophotometer: Die Konzentration von DNA, RNA oder PNA in Lösung wurde mit dem NanoDrop ND1000 Spektrophotometer von *NanoDrop Technologies* (Wilmington, DE, USA) bestimmt. Die Ermittlung der Konzentration einer Oligonukleotid-Lösung erfolgte auf Basis der Optischen-Dichte-Bestimmung bei $\lambda = 260$ nm. Der molare Extinktionskoeffizient wurde mithilfe der Online-Rechenmaske *Oligo Extinction Coefficient Calculator* (Eva Freisinger, Universität Zürich, Schweiz) bestimmt.

Präparative HPLC-UV/VIS: Für die RNA-Reinigung wurde das 1105 HPLC System (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA) eingesetzt. Es wurde eine Säule des Typs Waters X-Bridge BEH130 C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m) bei 55 °C verwendet. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min und der Gradient wurde in der Regel 0 % bis 40 % Acetonitril über 20 min gewählt. Als mobile Phase wurden Acetonitril als Eluent A und 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) als Eluent B verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem UV/VIS-Detektor, fraktioniert wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Für nicht-gelabelte RNA wurde als zweite Detektions-Wellenlänge $\lambda = 280$ nm gewählt; für gelabelte RNA die dem jeweiligen Fluorophor oder Quencher charakteristische Anregungswellenlänge.

Real-time PCR-Thermocycler: Der BRCA-Assay wurde am iQ5 Real-Time PCR Detection System (*Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Die Amplifikation und Detektion der Fluoreszenz auf *SYBR-Gold*-Basis wurde bei 57 °C in 96-Well PCR-Platten durchgeführt. Anregungs- und Emissionswellenlänge lagen entsprechend bei 485 ± 20 nm sowie 530 ± 20 nm.

Thermocycler: Tgradient 96 (*Biometra*, Göttingen).

6.7 Molekularbiologische Methoden

PCI-Extraktion: Kleine Volumina einer wässrigen RNA- oder DNA-Lösung wurden vor Zugabe der PCI-Lösung mit H₂O auf ein praktikables Volumen gebracht. Die Lösung wurde mit PCI-Lösung (1:1, v/v) versetzt; nach kurzem Vortexen bis zur Vermischung, folgte ein Zentrifugier-Schritt zur Phasentrennung (RT, 1 min, 17.000 g). Die wässrige Phase wurde abgenommen und der Vorgang erneut durchgeführt. Die nun erhaltene wässrige Phase wurde mit EtOH gefällt. Im Falle geringer Mengen vorhandener RNA wurde eine Rückextraktion durchgeführt und die wässrigen Phasen vor der Präzipitation vereinigt.^[211]

DNA-/RNA-Präzipitation: Einer Lösung mit RNA oder DNA in einem gegebenen Volumen wurden von 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,5 bis 3 Volumina EtOH (vorgekühlt auf -20 °C) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen erfolgte die Inkubation über Nacht bei -20 °C. Zur Aufarbeitung wurde für ca. 30 min (4 °C, 17.000 g) zentrifugiert, das Pellet mit kaltem 80%igem EtOH gewaschen und erneut für ca. 10 min (4 °C, 17.000 g) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet, bevor es in H₂O oder 1 mM Ammoniumcitrat (pH 6,4) aufgenommen wurde.

T7-RNA-*in-vitro*-Transkription: Für eine Transkription wurde das *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7* oder das *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit* nach den jeweiligen Angaben des Herstellers verwendet. Vor jeder Transkription wurde der T7-Primer (für die Generierung des ds-T7-Promotors) und das ssDNA-Templat für die T7-Transkription für 3 min bei 95 °C inkubiert, danach langsam über ca. 30 min auf RT abgekühlt. Nach Verdau mit DNase I (0,1 U/μl), PCI-Extraktion erfolgte die EtOH-Präzipitation. Gegebenenfalls wurde mit Amicon 10 K-Zentrifugenfiltern entsalzt und mit präparativer HPLC-UV/VIS gereinigt.

***fed-batch*-Methode für GMP^{Prg}:** Es wurde das *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7* verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde der Reaktionsansatz initial mit nur 0,75 mM rGTP, aber zusätzlich 6,75 mM GMP^{Prg} versetzt. Über 2 h wurden alle 15 min 0,84 mM rGTP zugeführt. Anschließend wurde die Reaktion für weitere 30 min inkubiert. Es folgte der Verdau mit DNase I analog zu den Herstellerangaben, PCI-Extraktion und EtOH-Fällung. Ein Standard-Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden finalen Konzentrationen in einem Volumen von 100 μl zusammen: 6,6 μM T7-Primer; 7,5 μg/100 μl DNA-Templat; *T7 Transcription 1x Buffer*; 10 mM MgCl₂; 7,5 mM rNTPs (außer rGTP: 0,75 mM + 8 x 0,84 mM); 6,75 mM GMP^{Prg}; 10 μl *Enzyme Mix (T7)*.

***fed-batch*-Methode für Azido-G:** Es wurde das *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit* oder die *in-house*-T7-RNA-Polymerase (*ihT7*-RNAPol) verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde der Reaktionsansatz initial mit nur 0,75 mM rGTP, aber zusätzlich 6,75 mM Azido-G versetzt.

Über 2 h wurden alle 15 min 0,84 mM rGTP zugeführt. Anschließend wurde die Reaktion für weitere 30 min inkubiert. Es folgte der Verdau mit DNase I (0,1 U/μl), PCI-Extraktion und EtOH-Fällung.

Ein Standard-Reaktionsansatz mit dem *TranscriptAid*-Kit setzte sich aus folgenden finalen Konzentrationen in einem Volumen von 100 μl zusammen: 6,6 μM T7-Primer; 7,5 μg/100 μl DNA-Templat; 1x *TranscriptAid Reaction Buffer*; 10 mM MgCl₂; 7,5 mM rNTPs (außer rGTP: 0,75 mM + 8 x 0,84 mM); 6,75 mM Azido-G; 10 μl *Transcript Aid Enzyme Mix*.

Ein Standard-Reaktionsansatz mit der *in-house*-T7-RNA-Polymerase setzte sich aus folgenden finalen Konzentrationen in einem Volumen von 100 μl zusammen: 6,6 μM T7-Primer; 7,5 μg/100 μl DNA-Templat; 1x T7-Reaktionspuffer; 10 mM MgCl₂; 7,5 mM rNTPs (außer rGTP: 0,75 mM + 8 x 0,84 mM); 6,75 mM Azido-G; 10 mM DTT; 0,2 U/μl RNase-Inhibitor; 0,0005 U/μl Pyrophosphatase, 0,2 mg/ml T7-RNA-Polymerase.

run-off-Methode für Azido-G: Es wurde die *in-house*-T7-RNA-Polymerase verwendet. Ein Standard-Reaktionsansatz mit der *in-house*-T7-RNA-Polymerase nach der *run-off*-Methode wurde ähnlich der *fed-batch*-Methode konzipiert, jedoch mit einmalig 0,75 mM rGTP. Die finalen Konzentrationen in einem Ansatz von 100 μl betrugen: 6,6 μM T7-Primer; 7,5 μg/100 μl DNA-Templat; 1x T7-Reaktionspuffer; 22 mM MgCl₂; 7,5 mM rNTPs (außer rGTP: 0,75 mM); 7,5 mM Azido-G; 10 mM DTT; 0,2 U/μl Ribolock; 0,0005 U/μl Pyrophosphatase, 0,2 mg/ml T7-RNA-Polymerase. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 4 h inkubiert, bevor der Verdau mit DNase I und die Aufarbeitung erfolgte.

CIP-Dephosphorylierung: Für die Dephosphorylierung von RNA wurde die Alkaline Phosphatase CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, NEB) verwendet. Dafür wurden alle Komponenten in einem Volumen von 200 μl mit folgenden finalen Mengen und Konzentrationen vereinigt: 0,75 nmol RNA; 1x *NEBuffer 3* (NEB); 0,3 U/μl Ribolock RNase-Inhibitor; 0,1 U/μl CIP. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei 37 °C. Nach der Reaktion erfolgte die Aufarbeitung mit PCI-Extraktion, EtOH-Präzipitation und Amicon-Zentrifugenfiltern.

PNK-Phosphorylierung: Für die Phosphorylierung von RNA wurde die T4-Polinukleotid-kinase (PNK, NEB) verwendet. In einem Volumen von 50 μl wurden die Komponenten mit folgenden finalen Mengen und Konzentrationen vereinigt: 300 pmol RNA; 1x *T4 PNK Reaction Buffer* (NEB); 0,3 U/μl Ribolock RNase-Inhibitor; 0,4 U/μl PNK. Die Inkubationszeit betrug 4 h bei 37 °C. Für den Einsatz in die circLigation erfolgte die Verwendung des Ansatzes ohne Aufarbeitung. Andernfalls erfolgte die Aufarbeitung mit PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation.

Ligation mit T4-RNA-Ligase zur Zyklisierung (circLigation): Die enzymatische circLigation von RNA wurde mit der T4-RNA-Ligase-1 durchgeführt. Die RNA wurde aus dem T4-PNK-Ansatz ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Die finalen Konzentrationen in einem Volumen von 100 μl waren: 0,5

μM RNA; *1x RNA Ligation Buffer* (NEB); 0,4 U/ μl Ribolock RNase-Inhibitor; 10 % DMSO; 1 mM ATP; 0,5 U/ μl T4-RNA-Ligase-1. Zunächst wurden nur die RNA und Wasser vereinigt und für 3 min bei 95 °C inkubiert und über 30 min auf RT abgekühlt. Danach folgten die Zugabe der übrigen Komponenten und die Inkubation des Reaktionsansatzes für ca. 20 h bei 16 °C. Nach der Reaktion erfolgte die Aufarbeitung mit PCI-Extraktion und EtOH-Präzipitation.

Ligation von Nukleotiden am 3'-Terminus mit T4-RNA-Ligase-1: Zur Ligation eines modifizierten Nukleotids an das 3'-OH-Ende von RNA wurde die T4-RNA-Ligase-1 (NEB) verwendet. Dafür wurde zunächst die verwendete Menge RNA für 3 min bei 95 °C inkubiert und danach langsam über ca. 30 min auf RT abgekühlt. Danach wurden die übrigen Komponenten zugegeben und der Ansatz für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die finalen Konzentrationen waren: *1x T4 RNA Ligase Buffer* (NEB); 10 % DMSO; 0,65 mM Nukleotid; 1 mM ATP; 0,8 U/ μl RNase-Inhibitor; 1 U/ μl T4-RNA-Ligase-1 (NEB) und maximal 6 μM RNA. Das Standard-Reaktionsvolumen betrug 50 μl oder ein Vielfaches davon. Je nach Anwendung folgte der direkte Einsatz in die CuAAC oder die Aufarbeitung über PCI-Extraktion und EtOH-Fällung.

PCR zur Generierung von dsDNA-Templat vom Plasmid: Für die PCR wurde das *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Templat diente ein Plasmid mit der zu amplifizierenden T7-Promotor- und CRKL-Sequenz. Die Bestimmung der Schmelztemperaturen und der Annealingtemperatur erfolgte mit dem *Tm calculator* (NEB, tmcalculator.neb.com). Die Reaktion wurde mit folgenden finalen Konzentrationen in 50- μl -Ansätzen durchgeführt: *1x HF Buffer*; 200 μM dNTPs; 0,5 μM Forward Primer; 0,5 μM Reverse Primer, 10 ng DNA-Templat; 0,5 μl Phusion DNA Polymerase. Nach der Reaktion erfolgte die Aufarbeitung mit dem *MinElute PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben und anschließende Konzentrationsbestimmung.

Temperaturprogramm PCR:

1	Denaturierung	98 °C	30 sec	30 Zyklen
2	Denaturierung	98 °C	5 sec	
	Annealing	65 °C	30 sec	
	Elongation	72 °C	15 sec	
3	Finale Elongation	72 °C	7 min	

CuAAC mit gelabeltem Azid: Für die Click-Reaktion direkt nach der T7-RNA-Transkription wurde das mit DNase-I-Verdau, PCI-Extraktion und EtOH-Fällung gereinigte Transkriptionsprodukt eines 100- μl -Transkriptionsansatzes in einem großen Click-Ansatz eingesetzt. Für andere RNA-Lösungen einer definierten Konzentration wurde ein Vielfaches des kleinen Click-Ansatzes verwendet. *Großer Click-Ansatz:* *1x PUS-Puffer*; RNA eines 100- μl -Transkriptionsansatzes; 300 μM Azid; 3,75 mM

THPTA; 7,5 mM HAsc; 0,75 mM CuSO₄ in einem Reaktionsvolumen von 100 µl. *Kleiner Click-Ansatz:* 1x PUS-Puffer; 3-5 µM RNA; 100 µM Azid; 2,5 mM THPTA; 5 mM HAsc; 0,5 mM CuSO₄ in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Die HAsc-Lösung wurde direkt vor Gebrauch hergestellt. Die Komponenten wurden genau in der angegebenen Reihenfolge pipettiert. Ein Entgasen der verwendeten Stock-Lösungen und des Reaktionsansatzes mit Argon wurde optional durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 1-2 h im Thermoschüttler bei 25 °C, 250 rpm und der Ansatz wurde abgedunkelt, wenn Fluorophore involviert waren. Zur Aufarbeitung wurden zwei Varianten verwendet: *1. Variante:* Die Reinigung erfolgte über eine NAP-5-Säule nach Herstellerangaben mit anschließender EtOH-Fällung. *2. Variante:* Besonders für kleine Testansätze wurde mit Amicon Zentrifugenfiltern entsalzt. Beiden Varianten folgte optional eine weitere Reinigung/Analyse mit präparativer HPLC.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE): Für die PAGE-Analyse wurden denaturierende Gele mit 8 M Urea mit unterschiedlichem Acrylamid-Anteil und ohne Sammelgel verwendet. Für die Gelherstellung wurden 5 ml der PA-Gel-Lösung mit 25 µl APS und 5 µl TEMED versetzt, gevortext und gegossen. Die PA-Gel-Lösung wurde vor der Zugabe von APS und TEMED mit denat. Urea-Puffer verdünnt, wenn ein Gel mit einem PA-Anteil < 20 % verwendet werden sollte. Die Polymerisationszeit betrug ca. 30-60 min. Es wurde das *Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System* von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) verwendet. Für den Lauf wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Beladen erfolgte ein ca. 30-minütiger Vorlauf bei entsprechender Laufspannung. Denaturierende Gele wurden unter Verwendung von 1x FLB oder 8 M Urea beladen und die Proben vor dem Beladen außerdem für 5-10 min bei 95 °C erhitzt.

PA-Gel-Analyse: Zur Visualisierung wurden die Gele nach dem Lauf mit *SYBR Gold* angefärbt. Dafür wurde das Gel ca. 10 min in verdünnter *SYBR-Gold*-Lösung (1 µl auf 10 ml 0,5 x TBE) inkubiert. Die Banden wurden mit dem Bildgebungssystem Image Station IS4000MMpro (Kodak) bei $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ visualisiert. Gele mit Fluorophor-gelabelter RNA wurden zunächst ohne Anfärbung bei ihren entsprechenden Wellenlängen visualisiert.

Fluoreszenz-basierender Dicer-vermittelter Reifungsassay: Vor dem Einsatz im Dicer-Spaltungs-Assay erfolgte ein De- und Renaturierungsschritt der dual gelabelten Sonde in 1x Dicer-Puffer indem für 3 min bei 95 °C inkubiert und danach langsam über ca. 30 min auf RT abgekühlt wurde. Für den Dicer-Spaltungs-Assay wurde der Dicer-vermittelte Fluoreszenzanstieg bei 37 °C im Abstand von je 30 min über einen Zeitraum von 4 h gemessen. Dafür wurden 1x Dicer-Puffer, 100 nM pre-miRNA-Sonde und 25 U/ml rhDicer in einem Volumen von 50-100 µl in einer 3 x 3 mm Ultra-Mikro-Küvette vereinigt und mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer über 4-6 h bei einer dem verwendeten Fluorophor entsprechenden Wellenlänge oder Wellenlängenbereich vermessen. Zu Beginn der Messung erfolgte einmalig die Messung ohne rhDicer als Vergleichswert. Eine zusätzliche, analoge Messung mit

denaturiertem (10 min bei 95 °C) rhDicer veranschaulichte die Stabilität der Sonde bzw. den Fluoreszenzanstieg ohne aktiven rhDicer *in vitro* über den Messzeitraum.

Methoden zum BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay

RNA-*in-vitro*-Transkription (für BRCA-Assay): Die Transkription und Aufarbeitung wurde mit dem *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor der Transkription wurde der T7-Primer (T7-Promotor-Sequenz) und das ssDNA-Templat für die T7-Transkription für 3 min bei 95 °C inkubiert, danach langsam über ca. 30 min auf RT abgekühlt. Nach Verdau mit DNase I, PCI-Extraktion, Ethanol-Präzipitation und Entsalzung mit Amicon 10 K-Zentrifugenfiltern wurde das Transkript mit präparativer HPLC-UV/VIS nochmals gereinigt.

Zyklisierung linearer 5'-phosphorylierter ssDNA: Für die Ligation wurde ein 5'-phosphoryliertes ssDNA-Templat verwendet. Die Zyklisierung mit der CircLigase ssDNA Ligase erfolgte nach Angaben des Herstellers mit folgender Modifizierung in den Inkubationszeiten: 4 h bei 60 °C, gefolgt von 12 h bei 16 °C und abschließend eine Hitzeinaktivierung über 10 min bei 80 °C. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit einem Amicon 3 K-Zentrifugenfilter entsalzt.

Ago2-Cleavage-Assay: Der Ago2-vermittelte Spaltungs-Assay basiert auf vorhergehenden Arbeiten.^[74, 205] Die Standard-Reaktionsbedingungen in einem Gesamtvolumen von 15 µl waren: 40 nM rhAgo2, 100 nM miR-122, 100 nM mRNA-ähnliches Substrat, 1x Ago2-Reaktionspuffer, optional eine Testsubstanz in gewünschter Konzentration. Vorinkubiert (60 min, 30 °C) wurde ohne mRNA-ähnliches Substrat, welches danach in einem Volumen von 2 µl zugegeben wurde, gefolgt von einer erneuten Inkubationsphase (60 min, 30 °C).

BRCA-Assay: Der BRCA-Assay basiert auf vorhergehenden Arbeiten.^[83] Vom Ago2-vermittelte Spaltungs-Assay wurden jeweils 4-5 µl in einen BRCA-Reaktionsansatz transferiert. Dieser enthielt in einem finalen Volumen von 20 µl: 1x *ThermoPol® Reaction Buffer* (zur Bst-Polymerase mitgeliefert); 0,2 mM dNTPs; 0,2 µM Sekundärprimer; 1:20.000 Verdünnung *SYBR Gold*; 2,5 nM zirkuläres ssDNA-Templat; 5 % DMSO und 0,4 U/µl Bst-DNA-Polymerase (*Large Fragment*). Um den Normalisierungswert für eine Testsubstanz zu erhalten, wurde eine entsprechende Konzentration der Testsubstanz zusammen mit einer Positivkontrolle aus dem Ago2-vermittelten Spaltungs-Assay zu einem BRCA-Ansatz hinzugefügt. Die Testsubstanz sollte den Fluoreszenzanstieg in der Positivkontrolle im Idealfall nicht beeinträchtigen. Die Ansätze wurden auf Eis in 96-Well-PCR-Platten pipettiert. Inkubation und Amplifikation wurde bei 57 °C für mindestens 90 min in einem *real-time*-PCR-Thermocycler durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Fluoreszenz-Anstieg im initialen linearen Bereich bestimmt.

Berechnung Ago2-Aktivität für Testsubstanzen: Um die verbleibende Ago2-Aktivität im Ago2-Assay für eine gegebene Testsubstanz und Konzentration in Prozent zu berechnen, wurde der Fluoreszenzanstieg im linearen Bereich für folgende Ansätze bestimmt: 1) Ansatz in Anwesenheit der Testsubstanz im Ago2-Assay (=Testansatz); 2) Ansatz ohne mRNA-ähnliches Substrat und ohne Testsubstanz im Ago2-Assay (=Negativkontrolle); und 3) Ansatz ohne Testsubstanz im Ago2-Assay, aber Zugabe dieser im BRCA-Assay für den Normalisierungswert (=Positivkontrolle). Demnach wurde die Aktivität wie folgt ermittelt:

$$\text{Ago2-Aktivität (\%)} = \frac{m(\text{Testsubstanz}) - m(\text{Negativkontrolle})}{m(\text{Positivkontrolle}) - m(\text{Negativkontrolle})} \cdot 100.$$

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bartel DP, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**, *116*, 281-297.
2. He L, Hannon GJ, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522-531.
3. Li J, Tan S, Kooger R, Zhang C, Zhang Y, MicroRNAs as novel biological targets for detection and regulation. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 506-517.
4. Tsai LM, Yu D, MicroRNAs in common diseases and potential therapeutic applications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2010**, *37*, 102-107.
5. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U *et al.*, Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **2013**, *495*, 333-338.
6. Nobelprize.org, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006, Andrew Z. Fire, Craig C. Mello, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/advanced.html.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
8. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA, Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 3191-3197.
9. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ, An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **2000**, *404*, 293-296.
10. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**, *409*, 363-366.
11. Lee RC, Ambros V, An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **2001**, *294*, 862-864.
12. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP, An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **2001**, *294*, 858-862.
13. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **2001**, *294*, 853-858.
14. Ruvkun G, Ambros V, Coulson A, Waterston R, Sulston J, Horvitz HR, Molecular genetics of the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14*. *Genetics* **1989**, *121*, 501-516.
15. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843-854.
16. Hannon GJ, RNA interference. *Nature* **2002**, *418*, 244-251.
17. Cullen BR, RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 597-599.
18. McManus MT, Sharp PA, Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 737-747.
19. Ling H, Fabbri M, Calin GA, MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 847-865.
20. Montgomery MK, Xu S, Fire A, RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 15502-15507.
21. Crick F, Central dogma of molecular biology. *Nature* **1970**, *227*, 561-563.
22. Jayaraj GG, Nahar S, Maiti S, Nonconventional chemical inhibitors of microRNA: therapeutic scope. *Chem. Commun. (Camb.)* **2015**, *51*, 820-831.
23. Monroig Pdel C, Chen L, Zhang S, Calin GA, Small molecule compounds targeting miRNAs for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *81*, 104-116.
24. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X, MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6207-6233.
25. Bobbin ML, Rossi JJ, RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 103-122.
26. Lai EC, microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R925-936.
27. Kim VN, Han J, Siomi MC, Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 126-139.
28. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK, RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 657-685.
29. Zamore PD, Haley B, Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **2005**, *309*, 1519-1524.

30. Sioud M, RNA interference: mechanisms, technical challenges, and therapeutic opportunities. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1218, 1-15.
31. Yang L, Froberg JE, Lee JT, Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, 39, 35-43.
32. Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB, Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, 1859, 163-168.
33. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J, Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **2013**, 495, 384-388.
34. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE, Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* **2013**, 19, 141-157.
35. Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, Kinzler KW, Vogelstein B, Scrambled exons. *Cell* **1991**, 64, 607-613.
36. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO, Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One* **2012**, 7, e30733.
37. Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, Kjems J, miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J.* **2011**, 30, 4414-4422.
38. Zhao ZJ, Shen J, Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer. *RNA Biol.* **2015**, 1-8.
39. Carthew RW, Sontheimer EJ, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **2009**, 136, 642-655.
40. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **2004**, 23, 4051-4060.
41. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R, The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **2004**, 432, 235-240.
42. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **2004**, 432, 231-235.
43. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN, MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **2002**, 21, 4663-4670.
44. Zeng Y, Cullen BR, Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* **2003**, 9, 112-123.
45. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **2003**, 425, 415-419.
46. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN, Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **2006**, 125, 887-901.
47. Zeng Y, Yi R, Cullen BR, Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* **2005**, 24, 138-148.
48. Heo I, Ha M, Lim J, Yoon MJ, Park JE, Kwon SC, Chang H, Kim VN, Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell* **2012**, 151, 521-532.
49. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **2003**, 17, 3011-3016.
50. Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN, Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* **2011**, 475, 201-205.
51. Tian Y, Simanshu DK, Ma JB, Park JE, Heo I, Kim VN, Patel DJ, A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Mol. Cell* **2014**, 53, 606-616.
52. Lee HY, Doudna JA, TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA* **2012**, 18, 2012-2019.
53. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R, TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **2005**, 436, 740-744.
54. Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ, The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* **2002**, 16, 2733-2742.
55. Peters L, Meister G, Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* **2007**, 26, 611-623.
56. Ha M, Kim VN, Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, 15, 509-524.
57. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA, PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, 12, 246-258.
58. Kawamata T, Tomari Y, Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, 35, 368-376.
59. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ, Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **2004**, 305, 1437-1441.

-
60. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD, Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **2003**, *115*, 199-208.
 61. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **2003**, *115*, 209-216.
 62. Lau PW, MacRae IJ, The molecular machines that mediate microRNA maturation. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 54-60.
 63. Davies BP, Dissertation, *A Homogenous Fluorescence Assay of micro RNA Maturation*, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, **2008**.
 64. Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S, Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol. Cell* **2015**, *59*, 117-124.
 65. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA, Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9667-9672.
 66. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH, MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 460-471.
 67. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I, MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **2008**, *455*, 1124-1128.
 68. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **2007**, *318*, 1931-1934.
 69. Kobayashi H, Tomari Y, RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 71-81.
 70. Ye Z, Jin H, Qian Q, Argonaute 2: A Novel Rising Star in Cancer Research. *J. Cancer* **2015**, *6*, 877-882.
 71. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L, Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **2004**, *305*, 1434-1437.
 72. Parker JS, Roe SM, Barford D, Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* **2004**, *23*, 4727-4737.
 73. Schirle NT, MacRae IJ, The crystal structure of human Argonaute2. *Science* **2012**, *336*, 1037-1040.
 74. Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L, Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 340-349.
 75. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ *et al.*, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e179.
 76. Shi R, Chiang VL, Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques* **2005**, *39*, 519-525.
 77. de Planell-Saguer M, Rodicio MC, Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 869-878.
 78. Shen Y, Tian F, Chen Z, Li R, Ge Q, Lu Z, Amplification-based method for microRNA detection. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 322-331.
 79. Tian T, Wang J, Zhou X, A review: microRNA detection methods. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2226-2238.
 80. Johnson BN, Mutharasan R, Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges. *Analyst* **2014**, *139*, 1576-1588.
 81. Hamidi-Asl E, Palchetti I, Hasheminejad E, Mascini M, A review on the electrochemical biosensors for determination of microRNAs. *Talanta* **2013**, *115*, 74-83.
 82. Yin BC, Liu YQ, Ye BC, One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5064-5067.
 83. Neubacher S, Dojahn CM, Arenz C, A rapid assay for miRNA maturation by using unmodified pre-miRNA. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2302-2305.
 84. Duan R, Zuo X, Wang S, Quan X, Chen D, Chen Z, Jiang L, Fan C, Xia F, Lab in a tube: ultrasensitive detection of microRNAs at the single-cell level and in breast cancer patients using quadratic isothermal amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4604-4607.
 85. Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U, Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* **1994**, *265*, 2085-2088.
 86. Fire A, Xu SQ, Rolling replication of short DNA circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4641-4645.
 87. Jonstrup SP, Koch J, Kjems J, A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification. *RNA* **2006**, *12*, 1747-1752.
 88. Nilsson M, Barbany G, Antson DO, Gertow K, Landegren U, Enhanced detection and distinction of RNA by enzymatic probe ligation. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 791-793.

-
89. Cheng Y, Zhang X, Li Z, Jiao X, Wang Y, Zhang Y, Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 3268-3272.
 90. Dojahn CM, Dissertation, *Synthese und Screening von Inhibitoren der mikroRNA-Reifung*, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, **2012**.
 91. Li Z, Rana TM, Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 622-638.
 92. Velagapudi SP, Vummidi BR, Disney MD, Small molecule chemical probes of microRNA function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *24*, 97-103.
 93. Davies BP, Arenz C, A homogenous assay for micro RNA maturation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5550-5552.
 94. Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, Khvorova A, The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA* **2005**, *11*, 674-682.
 95. Davies BP, Arenz C, A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 49-55.
 96. Klemm CM, Berthelmann A, Neubacher S, Arenz C, Short and Efficient Synthesis of Alkyne-Modified Amino Glycoside Building Blocks. *European J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 2788-2794.
 97. Thomas JR, Hergenrother PJ, Targeting RNA with small molecules. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1171-1224.
 98. Vo DD, Staedel C, Zehnacker L, Benhida R, Darfeuille F, Duca M, Targeting the production of oncogenic microRNAs with multimodal synthetic small molecules. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 711-721.
 99. Velagapudi SP, Gallo SM, Disney MD, Sequence-based design of bioactive small molecules that target precursor microRNAs. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 291-297.
 100. Gumireddy K, Young DD, Xiong X, Hogenesch JB, Huang Q, Deiters A, Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 7482-7484.
 101. Young DD, Connelly CM, Grohmann C, Deiters A, Small molecule modifiers of microRNA miR-122 function for the treatment of hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7976-7981.
 102. Bose D, Jayaraj G, Suryawanshi H, Agarwala P, Pore SK, Banerjee R, Maiti S, The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 1019-1023.
 103. Shan G, Li Y, Zhang J, Li W, Szulwach KE, Duan R, Faghihi MA, Khalil AM, Lu L, Paroo Z, Chan AW, Shi Z *et al.*, A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 933-940.
 104. Zhang Q, Zhang C, Xi Z, Enhancement of RNAi by a small molecule antibiotic enoxacin. *Cell Res.* **2008**, *18*, 1077-1079.
 105. Melo S, Villanueva A, Moutinho C, Davalos V, Spizzo R, Ivan C, Rossi S, Setien F, Casanovas O, Simo-Riudalbas L, Carmona J, Carrere J *et al.*, Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 4394-4399.
 106. Tan GS, Chiu CH, Garchow BG, Metzler D, Diamond SL, Kiriakidou M, Small molecule inhibition of RISC loading. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 403-410.
 107. Schmidt MF, Korb O, Abell C, MicroRNA-specific argonaute 2 protein inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2122-2126.
 108. Calin GA, Croce CM, MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7390-7394.
 109. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T *et al.*, Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15524-15529.
 110. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA, microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **2007**, *302*, 1-12.
 111. Calin GA, Croce CM, MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 857-866.
 112. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T, Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 111-115.
 113. Wahid F, Khan T, Kim YY, MicroRNA and diseases: therapeutic potential as new generation of drugs. *Biochimie* **2014**, *104*, 12-26.
 114. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M, Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **2005**, *438*, 685-689.
 115. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M, microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* **2008**, *27*, 3300-3310.

-
116. Ottosen S, Parsley TB, Yang L, Zeh K, van Doorn LJ, van der Veer E, Raney AK, Hodges MR, Patick AK, In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 599-608.
117. van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, de Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, Kootstra NA, Reesink HW, Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *43*, 102-113.
118. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS, Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **2009**, *28*, 3526-3536.
119. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S, MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell* **2012**, *3*, 364-371.
120. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gulla A, Tagliaferri P, Tassone P, Caraglia M, Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids* **2014**, *3*, e194.
121. Wang L, Yu J, Xu J, Zheng C, Li X, Du J, The analysis of microRNA-34 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with corresponding pericarcinous tissues. *Gene* **2015**, *554*, 1-8.
122. Sheinerman KS, Umansky SR, Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, e150.
123. Zandberga E, Kozirovskis V, Abols A, Andrejeva D, Purkalne G, Line A, Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2013**, *52*, 356-369.
124. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N *et al.*, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 10513-10518.
125. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X *et al.*, Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **2008**, *18*, 997-1006.
126. Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Crawford F, Mullan MJ, Abdullah L, Umansky SR, Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)* **2012**, *4*, 590-605.
127. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T, Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, e78.
128. Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y, Circulating microRNAs after cardiac arrest. *Crit. Care Med.* **2012**, *40*, 3209-3214.
129. Zhang L, Xu Y, Jin X, Wang Z, Wu Y, Zhao D, Chen G, Li D, Wang X, Cao H, Xie Y, Liang Z, A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *154*, 423-434.
130. Casey MC, Sweeney KJ, Andrew Lawrence Brown J, Kerin MJ, Exploring circulating microRNA in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 12-22.
131. Freres P, Wenric S, Boukerroucha M, Fasquelle C, Thiry J, Bovy N, Struman I, Geurts P, Collignon J, Schroeder H, Kridelka F, Lifrange E *et al.*, Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer. *Oncotarget* **2015**, *7*, 5416-5428.
132. Zhang YC, Xu Z, Zhang TF, Wang YL, Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic tools for hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 9853-9862.
133. de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J, Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 443-453.
134. RosettaGenomics™, RosettaGX™ MicroRNA Technology, <http://www.rosettagx.com/microRNA>.
135. Bicker S, Khudayberdiev S, Weiss K, Zocher K, Baumeister S, Schratt G, The DEAH-box helicase DHX36 mediates dendritic localization of the neuronal precursor-microRNA-134. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 991-996.
136. Kim HH, Kim P, Phay M, Yoo S, Identification of precursor microRNAs within distal axons of sensory neuron. *J. Neurochem.* **2015**, *134*, 193-199.
137. Roy S, Caruthers M, Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries. *Molecules* **2013**, *18*, 14268-14284.
138. El-Sagheer AH, Brown T, New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 15329-15334.
139. Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC, Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 8783-8798.

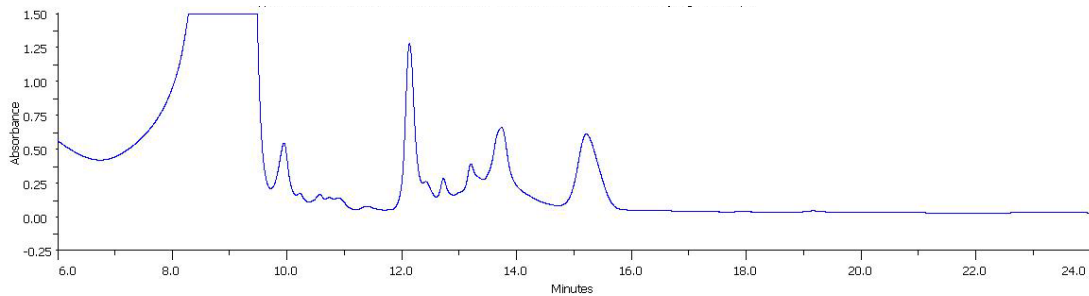
-
140. Rao H, Sawant AA, Tanpure AA, Srivatsan SG, Posttranscriptional chemical functionalization of azide-modified oligoribonucleotides by bioorthogonal click and Staudinger reactions. *Chem. Commun. (Camb.)* **2012**, 48, 498-500.
141. Grammel M, Hang H, Conrad NK, Chemical reporters for monitoring RNA synthesis and poly(A) tail dynamics. *ChemBioChem* **2012**, 13, 1112-1115.
142. Jao CY, Salic A, Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 15779-15784.
143. Paredes E, Das SR, Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA. *ChemBioChem* **2011**, 12, 125-131.
144. Kurata S, Ohtsuki T, Suzuki T, Watanabe K, Quick two-step RNA ligation employing periodate oxidation. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, e145.
145. Pitulle C, Kleinedam RG, Sproat B, Krupp G, Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis. *Gene* **1992**, 112, 101-105.
146. Schlatterer JC, Jäschke A, Universal initiator nucleotides for the enzymatic synthesis of 5'-amino- and 5'-thiol-modified RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 344, 887-892.
147. Pfander S, Fiammengio R, Kirin SI, Metzler-Nolte N, Jäschke A, Reversible site-specific tagging of enzymatically synthesized RNAs using aldehyde-hydrazine chemistry and protease-cleavable linkers. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, e25.
148. Wahl F, Jäschke A, PEG-tethered guanosine acetal conjugates for the enzymatic synthesis of modified RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 417, 1224-1226.
149. Schoch J, Ameta S, Jäschke A, Inverse electron-demand Diels-Alder reactions for the selective and efficient labeling of RNA. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, 47, 12536-12537.
150. Dojahn CM, Hesse M, Arenz C, A chemo-enzymatic approach to specifically click-modified RNA. *Chem. Commun. (Camb.)* **2013**, 49, 3128-3130.
151. England TE, Uhlenbeck OC, 3'-terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. *Nature* **1978**, 275, 560-561.
152. England TE, Uhlenbeck OC, Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase. *Biochemistry* **1978**, 17, 2069-2076.
153. Walker GC, Uhlenbeck OC, Bedows E, Gumport RI, T4-induced RNA ligase joins single-stranded oligoribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, 72, 122-126.
154. Barrio JR, Barrio MC, Leonard NJ, England TE, Uhlenbeck OC, Synthesis of modified nucleoside 3',5'-bisphosphates and their incorporation into oligoribonucleotides with T4 RNA ligase. *Biochemistry* **1978**, 17, 2077-2081.
155. Bruce AG, Uhlenbeck OC, Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res.* **1978**, 5, 3665-3677.
156. Kore AR, Charles I, Yang L, Kuersten S, Synthesis and activity of modified cytidine 5'-monophosphate probes for T4 RNA ligase 1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, 28, 292-302.
157. Proudnikov D, Mirzabekov A, Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4535-4542.
158. Jawalekar AM, Meeuwenoord N, Cremers JS, Overkleeft HS, van der Marel GA, Rutjes FP, van Delft FL, Conjugation of nucleosides and oligonucleotides by [3+2] cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 287-290.
159. Winz ML, Samanta A, Benzinger D, Jäschke A, Site-specific terminal and internal labeling of RNA by poly(A) polymerase tailing and copper-catalyzed or copper-free strain-promoted click chemistry. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, e78.
160. Lingner J, Keller W, 3'-end labeling of RNA with recombinant yeast poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2917-2920.
161. Tomkuvienė M, Clouet-d'Orval B, Cerniauskas I, Weinhold E, Klimasauskas S, Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 6765-6773.
162. Plotnikova A, Osipenko A, Masevicius V, Vilkaitis G, Klimasauskas S, Selective covalent labeling of miRNA and siRNA duplexes using HEN1 methyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 13550-13553.
163. Schulz D, Holstein JM, Rentmeister A, A chemo-enzymatic approach for site-specific modification of the RNA cap. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 7874-7878.
164. Holstein JM, Schulz D, Rentmeister A, Bioorthogonal site-specific labeling of the 5'-cap structure in eukaryotic mRNAs. *Chem. Commun. (Camb.)* **2014**, 50, 4478-4481.
165. Holstein JM, Stummer D, Rentmeister A, Enzymatic modification of 5'-capped RNA with a 4-vinylbenzyl group provides a platform for photoclick and inverse electron-demand Diels-Alder reaction. *Chemical Science* **2015**, 6, 1362-1369.

-
166. Ishizuka T, Kimoto M, Sato A, Hirao I, Site-specific functionalization of RNA molecules by an unnatural base pair transcription system via click chemistry. *Chem. Commun. (Camb.)* **2012**, 48, 10835-10837.
167. Li L, Degardin M, Laverne T, Malyshev DA, Dhami K, Ordoukhanian P, Romesberg FE, Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 826-829.
168. Domnick C, Eggert F, Kath-Schorr S, Site-specific enzymatic introduction of a norbornene modified unnatural base into RNA and application in post-transcriptional labeling. *Chem. Commun. (Camb.)* **2015**, 51, 8253-8256.
169. Holstein JM, Rentmeister A, Current covalent modification methods for detecting RNA in fixed and living cells. *Methods* **2016**, 98, 18-25.
170. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, Click-Chemie diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie* **2001**, 113, 2056-2075.
171. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB, A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596-2599.
172. Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, Fokin VV, Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853-2855.
173. Hong V, Presolski SI, Ma C, Finn MG, Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 9879-9883.
174. Kennedy DC, McKay CS, Legault MC, Danielson DC, Blake JA, Pegoraro AF, Stelow A, Mester Z, Pezacki JP, Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17993-18001.
175. Aigner M, Hartl M, Fauster K, Steger J, Bister K, Micura R, Chemical synthesis of site-specifically 2'-azido-modified RNA and potential applications for bioconjugation and RNA interference. *ChemBioChem* **2011**, 12, 47-51.
176. Beatty KE, Fisk JD, Smart BP, Lu YY, Szychowski J, Hangauer MJ, Baskin JM, Bertozzi CR, Tirrell DA, Live-cell imaging of cellular proteins by a strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *ChemBioChem* **2010**, 11, 2092-2095.
177. Liu DS, Tangpeerachaikul A, Selvaraj R, Taylor MT, Fox JM, Ting AY, Diels-Alder cycloaddition for fluorophore targeting to specific proteins inside living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 792-795.
178. Song W, Wang Y, Yu Z, Vera CI, Qu J, Lin Q, A metabolic alkene reporter for spatiotemporally controlled imaging of newly synthesized proteins in Mammalian cells. *ACS Chem. Biol.* **2010**, 5, 875-885.
179. Li N, Lim RK, Edwardraja S, Lin Q, Copper-free Sonogashira cross-coupling for functionalization of alkyne-encoded proteins in aqueous medium and in bacterial cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15316-15319.
180. Pyka AM, Domnick C, Braun F, Kath-Schorr S, Diels-Alder cycloadditions on synthetic RNA in mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25, 1438-1443.
181. Sawant AA, Tanpure AA, Mukherjee PP, Athavale S, Kelkar A, Galande S, Srivatsan SG, A versatile toolbox for posttranscriptional chemical labeling and imaging of RNA. *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44, e16.
182. Lawrence JB, Singer RH, Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* **1986**, 45, 407-415.
183. Bratu DP, Cha BJ, Mhlanga MM, Kramer FR, Tyagi S, Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 13308-13313.
184. Hövelmann F, Gaspar I, Ephrussi A, Seitz O, Brightness enhanced DNA FIT-probes for wash-free RNA imaging in tissue. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 19025-19032.
185. Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR, RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. *Science* **2011**, 333, 642-646.
186. Schulz D, Rentmeister A, Current approaches for RNA labeling in vitro and in cells based on click reactions. *ChemBioChem* **2014**, 15, 2342-2347.
187. Kim YH, Kwei KA, Girard L, Salari K, Kao J, Pacyna-Gengelbach M, Wang P, Hernandez-Boussard T, Gazdar AF, Petersen I, Minna JD, Pollack JR, Genomic and functional analysis identifies CRKL as an oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene* **2010**, 29, 1421-1430.
188. Siegel G, Obernosterer G, Fiore R, Oehmen M, Bicker S, Christensen M, Khudayberdiev S, Leuschner PF, Busch CJ, Kane C, Hubel K, Dekker F *et al.*, A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2009**, 11, 705-716.
189. Jopling C, Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.* **2012**, 9, 137-142.
190. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evtantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S, circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **2014**, 56, 55-66.

-
191. Zuker M, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406-3415.
 192. El-Sagheer AH, Sanzone AP, Gao R, Tavassoli A, Brown T, Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 11338-11343.
 193. Handlon AL, Oppenheimer NJ, Thiol reduction of 3'-azidothymidine to 3'-aminothymidine: kinetics and biomedical implications. *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 297-299.
 194. Samanta A, Krause A, Jaschke A, A modified dinucleotide for site-specific RNA-labelling by transcription priming and click chemistry. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 1313-1316.
 195. Kikuchi Y, Hishinuma F, Sakaguchi K, Addition of mononucleotides to oligoribonucleotide acceptors with T4 RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 1270-1273.
 196. Hinton DM, Baez JA, Gumport RI, T4 RNA Ligase joins 2'-deoxyribonucleoside 3',5'-bisphosphates to oligodeoxyribonucleotides. *Biochemistry* **1978**, *17*, 5091-5097.
 197. Kumar R, El-Sagheer A, Tumpance J, Lincoln P, Wilhelmsson LM, Brown T, Template-directed oligonucleotide strand ligation, covalent intramolecular DNA circularization and catenation using click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6859-6864.
 198. Shigi N, Sakaguchi Y, Suzuki T, Watanabe K, Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14296-14306.
 199. Davis GM, Haas MA, Pocock R, MicroRNAs: Not "Fine-Tuners" but Key Regulators of Neuronal Development and Function. *Front. Neurol.* **2015**, *6*, 245.
 200. Bushati N, Cohen SM, MicroRNAs in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2008**, *18*, 292-296.
 201. Berezikov E, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, Plasterk RH, Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1375-1377.
 202. Junn E, Mouradian MM, MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *133*, 142-150.
 203. Lugli G, Larson J, Martone ME, Jones Y, Smalheiser NR, Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 896-905.
 204. Kozomara A, Griffiths-Jones S, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D152-157.
 205. Nakanishi K, Weinberg DE, Bartel DP, Patel DJ, Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* **2012**, *486*, 368-374.
 206. Wong CH, Hendrix M, Priestley ES, Greenberg WA, Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 397-406.
 207. Means JA, Hines JV, Fluorescence resonance energy transfer studies of aminoglycoside binding to a T box antiterminator RNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2169-2172.
 208. Wang H, Tor Y, Electrostatic interactions in RNA aminoglycosides binding. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8734-8735.
 209. Luedtke NW, Baker TJ, Goodman M, Tor Y, Guanidinoglycosides: A novel family of RNA ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12035-12036.
 210. Tran TP, Vo DD, Di Giorgio A, Duca M, Ribosome-targeting antibiotics as inhibitors of oncogenic microRNAs biogenesis: Old scaffolds for new perspectives in RNA targeting. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5334-5344.
 211. Sambrook J, Russell DW, *Molecular Cloning a laboratory manual, Vol. 3rd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gold Spring Harbor, New York, **2001**.

8 ANHANG

A) CRKLsh-N₃, t = 13,8 min
blau = 260 nm



B)

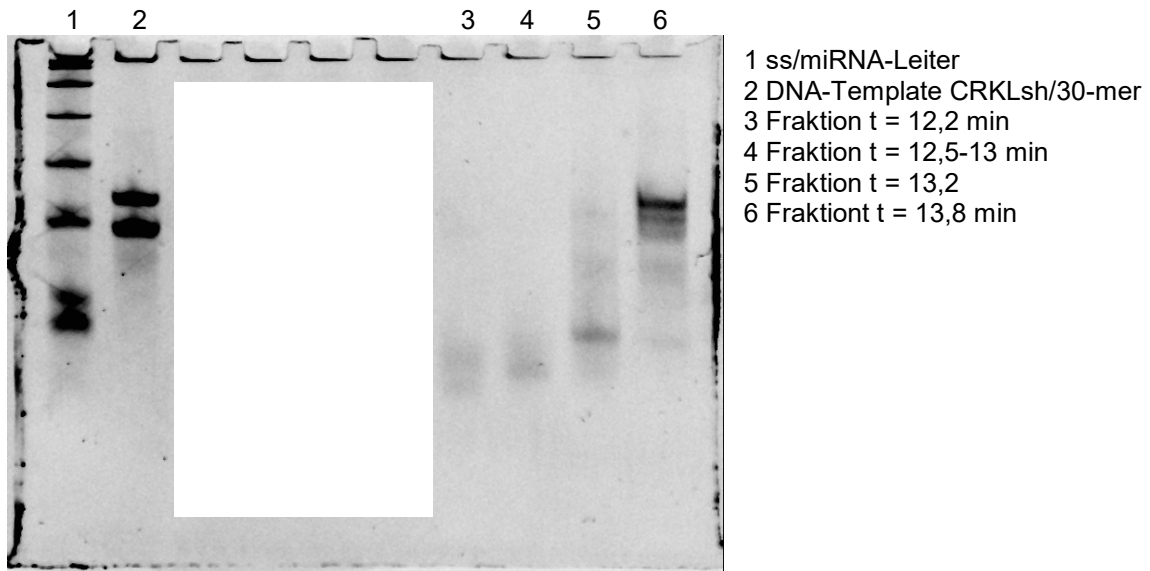
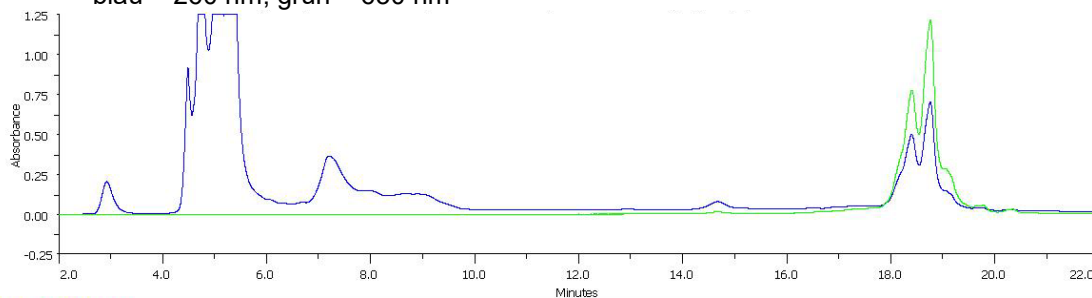
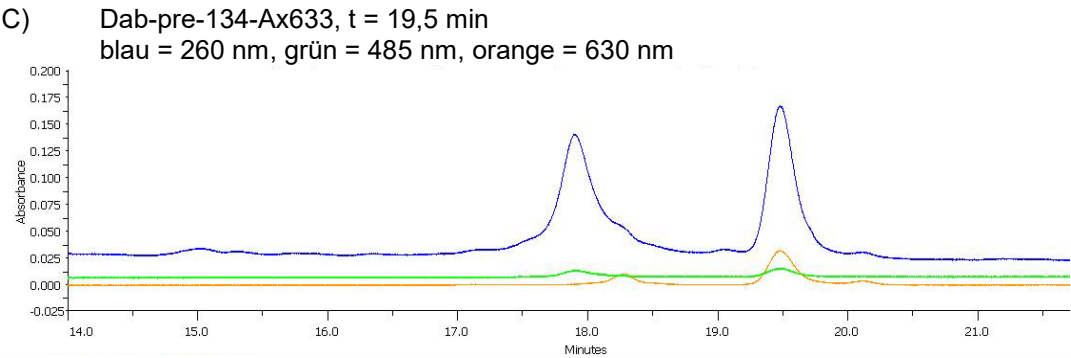
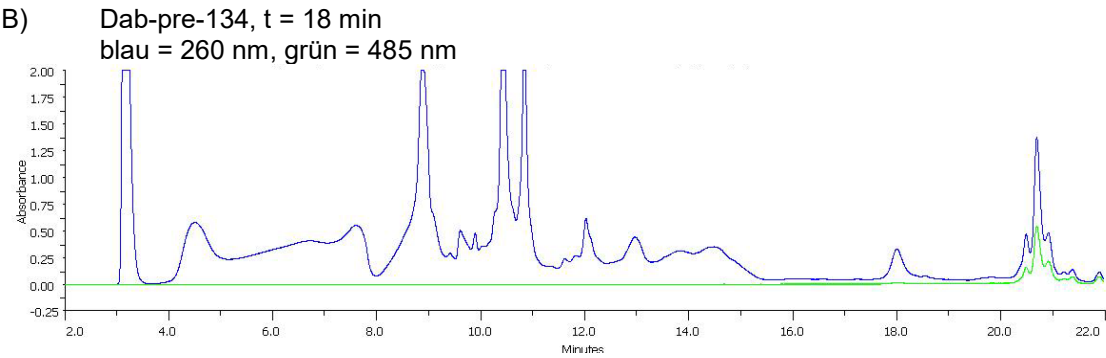


Abb. 8.1: Aufarbeitung von CRKLsh-N₃ mit präparativer HPLC (Gradient: 0-35 % über 20 min) nach Transkription mit der *run-off*-Methode unter Verwendung von Azido-G als Starternukleotid. A) Chromatogramm CRKLsh-N₃ (t = 13,8 min). B) Denaturierendes PA-Gel (8 %) mit verschiedenen Fraktionen nach präparativer HPLC von CRKLsh-N₃. SYBR Gold $\lambda_{\text{ex/em}}$ = 470/535 nm.

A) Cy3-pre-134, t = 14,5 min
blau = 260 nm, grün = 630 nm

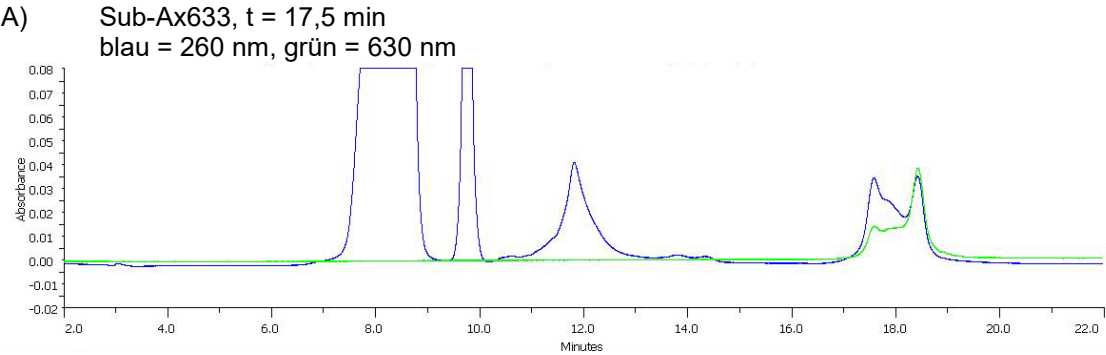




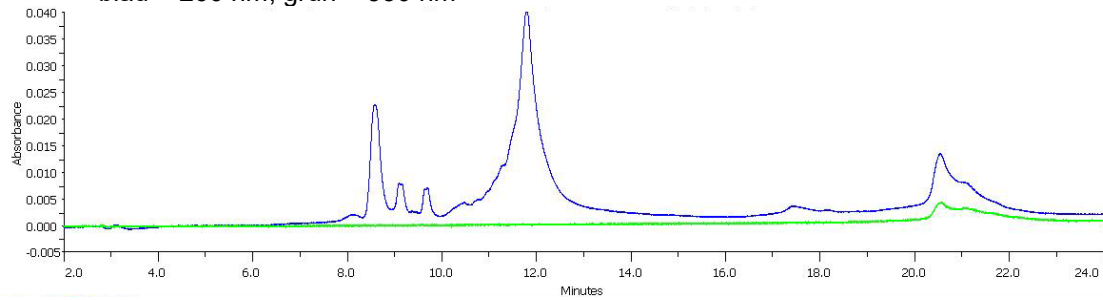
D)

	Cy3-pre-134	Dab-pre-134-Ax633
Ansatzgröße T7-Transkription	100 µl	100 µl
Ausbeute, absolut T7-Transkription: T4-Ligation:	Cy3-pre-134: ca. 80 pmol	Dab-pre-134: ca. 100 pmol Dab-pre-134-Ax633: ca. 20 pmol
Verhältnis gelabeltes : ungelabeltes Substrat nach Aufarbeitung	Cy3-134 : 134 ca. 1 : 20	Dab-134 : Dab-134-Ax633 ca. 1 : 1

Abb. 8.2: Aufarbeitung der Fluorophor-/Dabcyl-gelabelten pre-miR-134 mit präparativer HPLC (Gradient: 10-50 % (A) bzw. 0-40 % Acetonitril (B, C) über 20 min) nach *fed-batch*-T7-Transkription mit Prg-pG als Starternukleotid und CuAAC. A) Chromatogramm Cy3-pre-134 (t = 14,5 min). B) Chromatogramm Dab-pre-134 (t = 18 min). C) Chromatogramm Dab-pre-134-Ax633 (t = 19,5 min) D) Ausbeute der pre-134-Sonden Cy3-pre-134 und Dab-pre-134-Ax633.



B) Sub-Cy3, $t = 20,5$ min
blau = 260 nm, grün = 530 nm



C)

	Sub-Ax633	Sub-Cy3
Eingesetzte Menge RNA-Templat	600 pmol	600 pmol
Ausbeute, absolut	24 pmol	9 pmol
Ausbeute, relativ	4 %	1,5 %
Verhältnis gelabeltes : ungelabeltes Substrat nach Aufarbeitung	1 : 5	1 : 18

Abb. 8.3: Aufarbeitung der Fluorophor-gelabelten Substrate für den Ago2-Spaltungsassay mit präparativer HPLC (Gradient: 0-40 % Acetonitril über 20 min). A) Chromatogramm der Substrataufarbeitung von Sub-Ax633 ($t = 17,5$ min). B) Chromatogramm der Substrataufarbeitung von Sub-Cy3 ($t = 20,5$ min). C) Ausbeute Substrat-Fluorophor-Labeling.

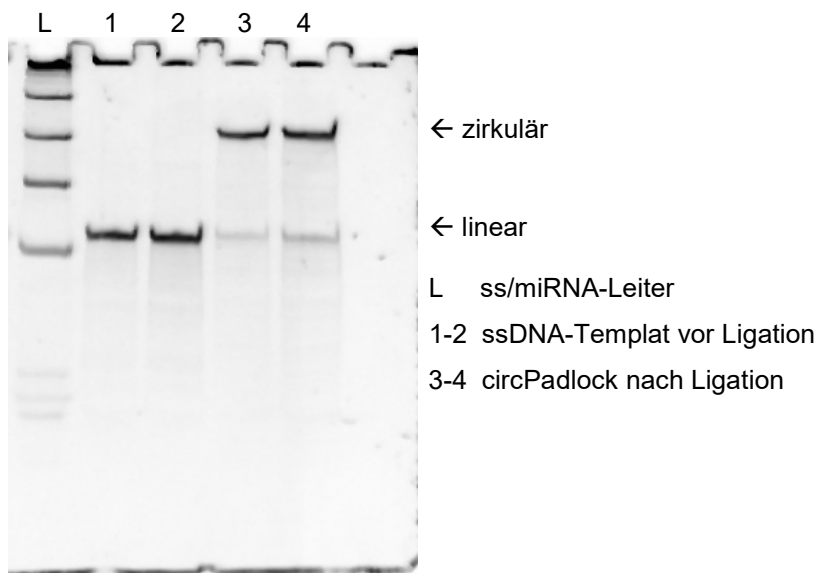


Abb. 8.4: Zyklisierung des ssDNA-Templates zum circPadlock für den BRCA-Assay. Denaturierendes PAGE (20 %) mit dem Padlock vor und nach der Ligationsreaktion mit der circLigase. SYBR Gold $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$ nm.

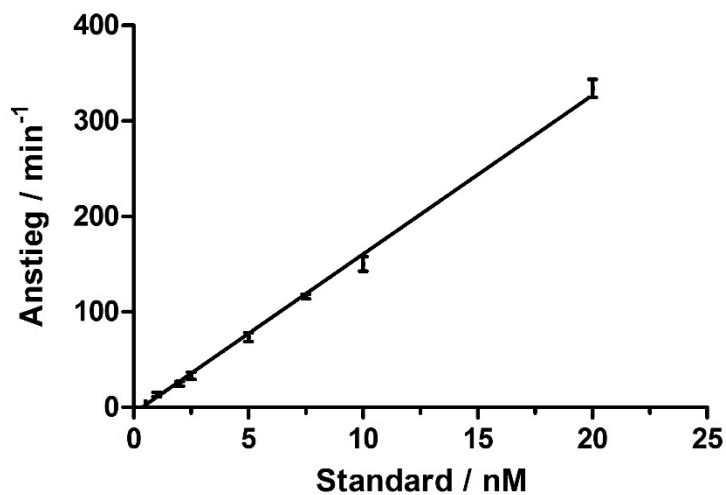


Abb. 8.5: Kalibrierung des BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassays. Kalibrierkurve mit 0 nM - 20 nM des Standards (entsprechend dem als Primer fungierenden Spaltproduktes). Die Matrix wurde äquivalent zu den Standardreaktionsbedingungen im BRCA-Assay gewählt, jedoch ohne rhAgo2. Mittelwerte \pm SD aus Triplikat-Messung. Wenn nicht dargestellt, ist SD kleiner als die Symbolgröße.

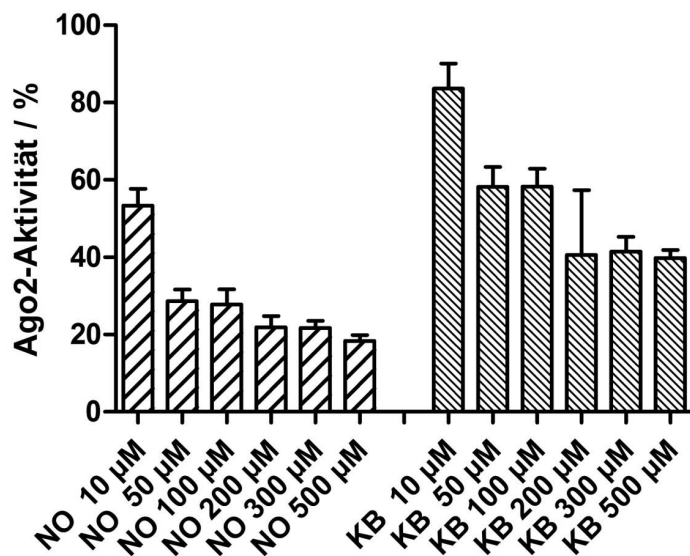


Abb. 8.6: Aminoglykoside Neomycin und Kanamycin B in unterschiedlichen Konzentrationen im BRCA-basierenden Ago2-vermittelten Spaltungsassay. Ago2-Aktivität nach Inkubation der Testsubstanz in den angegebenen Konzentrationen von 10 μ M bis 500 μ M im Ago2-Spaltungs-Schritt. Mittelwerte \pm SD von ≥ 3 unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat. KB: Kanamycin B, NO: Neomycin B.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Arenz für die Bereitstellung verschiedener interessanter Forschungsansätze und die stete Unterstützung in der kontinuierlichen Weiterentwicklung der unterschiedlichen Themen bei gleichzeitiger, vertrauensvoller Gewährleistung des wissenschaftlichen Freiraumes.

Der Arbeitsgruppe Arenz danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt Dr. Susanne Ficht-Redmer für die freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre positive Art, die jedes Problem in die richtige Perspektive zu rücken vermag. Bei Dr. Saskia Neubacher bedanke ich mich für die Einweisung in das RNase-freie Arbeiten. Dr. Claudine Dojahn danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet des RNA-Labelings.

Spezieller Dank gilt auch meinen Laborkollegen Stephanie Diederich, Christina Klotz und Laura Marongiu für ihre fachliche und tatkräftige Unterstützung. Dr. Felix Hövelmann danke ich für den vielfältigen Ideenaustausch.

Robert Harmel, Christian Kimmich und Alexandra Klose-Stier danke ich für die Bereitstellung der Nukleotid-Bausteine, ihr Engagement bei der Synthese und ihre fachliche Diskussionsbereitschaft. Christiane Schöniger möchte ich für den konstruktiven Austausch und die bereitwillige Arbeit am Synthesizer danken.

Der Arbeitsgruppe Seitz danke ich für die gewährte Mitbenutzung ihrer Geräte, die mit großer Hilfsbereitschaft und freundlichem Entgegenkommen einherging.

Für die gründliche und konstruktive Durchsicht des Manuskripts danke ich Dr. Gregor Koch und Dr. Andreas Koch.

Dr. Nicole Nischan danke ich für ihre emotionale wie fachliche Anteilnahme und die hilfreichen Gespräche.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre fortwährende Bereitschaft zum Zuhören und Rat geben, für ihre unablässige Zuversicht und für ihre Geduld. Insbesondere Gregor und meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und den starken Rückhalt.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 21/2009 am 06.07.2009 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 28. Juli 2016

Ort, Datum

Unterschrift